



NUEVAS ALTERNATIVAS PARA LA SIMPLIFICACIÓN Y MEJORA DE LA METODOLOGÍA DE ANÁLISIS DE METALES PESADOS EN MUESTRAS AMBIENTALES.

Tesis Doctoral

Juan José Pinto Ganfornina

Cádiz, 2008

D. Manuel García Vargas, Catedrático del Departamento de Química Analítica de la Universidad de Cádiz y D. Carlos Moreno Aguilar, Profesor Titular del Departamento de Química Analítica de la Universidad de Cádiz

CERTIFICAN:

Que los trabajos realizados por el Licenciado en Ciencias Químicas D. **Juan José Pinto Ganfornina** y recogidos bajo el título “*Nuevas alternativas para la simplificación y mejora de la metodología de análisis de metales pesados en muestras ambientales*” han sido realizados íntegramente en los laboratorios del Departamento de Química Analítica de esta Universidad bajo nuestra dirección, consituyendo la memoria necesaria para optar al Grado de Doctor en Ciencias Químicas.

Y para que así conste, firmamos la presente certificación en Puerto Real a catorce de abril de 2008.

Fdo.: Manuel García Vargas

Fdo.: Carlos Moreno Aguilar

D. Manuel García Vargas, Catedrático y Director del Departamento de Química Analítica de la Universidad de Cádiz

CERTIFICA:

Que el presente trabajo, realizado íntegramente en los laboratorios de este Departamento bajo la dirección conjunta de los Profesores D. Manuel García Vargas y D. Carlos Moreno Aguilar, reúne las condiciones exigidas para optar al Grado de Doctor en Ciencias Químicas.

Y para que así conste, expido y firmo el presente certificado, en Puerto Real a catorce de abril de 2008.

Fdo.: Manuel García Vargas

Parte de los trabajos descritos en la presente memoria se encuentran recogidos en las siguientes publicaciones y comunicaciones a congresos:

Publicaciones:

Pinto, J.J.; Moreno, C. and García-Vargas, M. (2004). *A very sensitive flow system for the direct determination of copper in natural waters based on spectrophotometric detection*. Talanta **64** (2), 562-565.

Juan J. Pinto, Carlos Moreno and Manuel García-Vargas. (2002). *A simple and very sensitive spectrophotometric method for the direct determination of copper ions*. Analytical and Bioanalytical Chemistry **373**, 844-848.

Juan J. Pinto, Carlos Moreno and Manuel García-Vargas. *A BLM-FI coupled system for the preconcentration and determination of vanadium in natural waters*. (En preparación)

Juan J. Pinto, Carlos Moreno and Manuel García-Vargas. *Development and validation of a spectrophotometric method for determination of zinc in natural waters*. (En preparación)

Congresos:

A BLM-FI coupled system for the preconcentration and determination of vanadium in natural waters. Juan J. Pinto, Carlos Moreno y Manuel García-Vargas. IX International Symposium on analytical methodology in the environmental field (IX ISAMEF), Mallorca, 1-5 de octubre de 2007.

La espectrofotometría como herramienta de trabajo en análisis de ultratrazas. Determinación directa de cinc en aguas naturales. J. J. Pinto Ganfornina, C. Moreno y M. García Vargas. X Reunión del Grupo Regional Andaluz de la Sociedad Española de Química Analítica, Cádiz, 8-9 de junio de 2006.

A flow system for the monitoring of copper in natural waters based on spectrophotometric detection. Juan Pinto, Carlos Moreno, Dolores Galindo-Riaño, Manuel García-Vargas. XXXIII Colloquium Spectroscopicum Internationale, Granada, 7-12 de septiembre de 2003.

Determination of copper in natural water based on a liquid membrane preconcentration system. Carlos Moreno, Juan J. Pinto, Dolores Galindo, Manuel García-Vargas. Solvent Extraction for the 21st century, Barcelona, 11-16 de julio de 1999.

Desde estas líneas quisiera expresar mi más sincero agradecimiento a todas aquellas personas, familia, amigos y compañeros, que de un modo u otro han mostrado su interés, cariño, apoyo y en muchas ocasiones paciencia, durante estos años de trabajo. Gracias a todos ellos por contribuir a que esta tesis llegue a buen fin.

En primer lugar, a D. Manuel García Vargas, Director de esta Tesis, por depositar su confianza en mí desde que me incorporé al Departamento de Química Analítica de la Universidad de Cádiz. Sus constantes muestras de apoyo a lo largo de estos años y sus inestimables consejos han contribuido no sólo a terminar este trabajo, sino también a formarme como docente.

También quisiera mostrar mi gratitud y más sincero cariño a D. Carlos Moreno Aguilar, Director de esta Tesis, por estar siempre ahí en todo momento, resolviendo dudas, quejas y cualquier tipo de problemas que han surgido durante el desarrollo de este trabajo. Para mí no sólo ha sido el mejor Director de Tesis que he podido tener, sino que me ha demostrado en todo momento que es un amigo con el que siempre podré contar.

A D^a. María Dolores Galindo Riaño y D^a. María del Pilar Martínez Martínez, con quienes comencé mi formación como investigador y que han seguido de cerca el desarrollo de la presente tesis, quisiera agradecerles sus muestras de apoyo y su disposición para resolver cualquier duda que les haya podido plantear.

A D. Manuel Pedro Manuel Vez, que ha mostrado siempre su interés por el desarrollo de este trabajo, quiero agradecerle sus constantes muestras de apoyo y cariño.

A D. Juan Fernández Verdugo, quien ha vivido de primera mano cada uno de los logros y satisfacciones de mi vida tanto personal como profesional, quisiera agradecerle todos sus consejos y muestras de apoyo incondicional a lo largo de todos estos años.

A D. Manuel Mora Garcés y D. Miguel Milla González, que siempre se han interesado por el desarrollo de este trabajo, mostrándome en todo momento su cariño y afecto, quisiera expresarles mi más sincera gratitud.

A mis amigos Antonio, Jose, Carolina, Beni, Gemma, Juanjo, Mariló, Mostapha y Jose, algunos de los cuales ya han emprendido otros caminos y con quienes he compartido los mejores y peores momentos de estos años, quiero agradecerles no sólo sus constantes muestras de apoyo y afecto sino también su contribución para mantener en todo momento un clima agradable de trabajo.

A todos mis compañeros del grupo de Investigación Geoquímica Marina, Estrella, Auxi, Maripaz, Félix, Abdellah, Cristina, Marga, María José y Clara, con los que he compartido parte de mi trabajo, les agradezco toda la ayuda que me han prestado así como los buenos momentos que he pasado en su compañía.

A todos mis compañeros del Departamento de Química Analítica, quiero agradecerles su interés y muestras de apoyo a lo largo de estos años.

A mis hermanos Miguel Angel, Luz María y Sergio, y a mi primo Juan Manuel, hacia los que no tengo suficientes palabras de agradecimiento. De tanto escucharme, vosotros conocéis este trabajo tan bien como yo.

A mis padres, que siempre han estado ahí mostrándome su apoyo incondicional en todas las decisiones que he tomado a lo largo de mi vida. Por darme siempre ánimos y enseñarme a luchar por lo que quiero. Gracias.

A Mari Carmen, mi esposa, por estar siempre ahí, dispuesta a escucharme durante horas hablar del FIA, del Síplex, de los problemas o de las alegrías de cada día de trabajo. Gracias por ser como eres, sin tí nunca podría haber terminado esta Tesis.

A mis padres

A Mari Carmen

A Sergio

ÍNDICE

OBJETIVOS DE LA TESIS

<u>CAPÍTULO 1. INTRODUCCIÓN</u>	1
1. INTRODUCCIÓN	3
2. LOS METALES PESADOS	7
2.1. Cobre	8
2.2. Cinc	10
2.3. Vanadio	12
3. DETERMINACIÓN DE METALES	14
3.1. Métodos de análisis de cobre en aguas naturales	14
3.1.1. Complejos orgánicos coloreados de cobre	14
3.1.2. Otros Métodos	26
3.2. Métodos de análisis de cinc en aguas naturales	31
3.2.1. Complejos orgánicos coloreados de cinc	32
3.2.2. Otros Métodos	36
3.3. Métodos de análisis de vanadio en aguas naturales	41
3.3.1. Complejos orgánicos coloreados de vanadio	41
3.3.2. Otros Métodos	52
4. SEPARACIÓN DE METALES. MEMBRANAS LÍQUIDAS	56
4.1. Sistemas de membrana líquida	57
4.1.1. Tipos de membranas líquidas	59
4.1.2. Variables que determinan el transporte	69

<u>CAPÍTULO 2. DESARROLLO, OPTIMIZACIÓN Y VALIDACIÓN DE NUEVOS MÉTODOS ANALÍTICOS DE ALTA SENSIBILIDAD PARA LA DETERMINACIÓN DE METALES (Cu, Zn, V) EN AGUAS NATURALES BASADOS EN COMPLEJOS ORGÁNICOS</u>	73
1. INTRODUCCIÓN	77
2. DESARROLLO EXPERIMENTAL	82
2.1. Ensayos Preliminares	82
2.2. Optimización de las condiciones de formación de los complejos	82
2.3. Validación del método	83
2.4. Aplicación a muestras reales	86
3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	87
3.1. <u>Nueva metodología analítica para determinación de cobre en aguas naturales</u>	87
3.1.1. Ensayos Preliminares	87
3.1.2. Optimización de las condiciones de formación del complejo	88
3.1.3. Validación del método	95
3.1.4. Aplicación a muestras reales	115
3.2. <u>Determinación de trazas de cinc mediante la formación de un quelato coloreado</u>	117
3.2.1. Ensayos Preliminares	117
3.2.2. Optimización de las condiciones de formación del complejo	118
3.2.3. Validación del método	127
3.2.4. Aplicación a muestras reales	144

<u>3.3. Método simple y efectivo para la determinación de vanadio en aguas naturales</u>	146
3.3.1. Ensayos Preliminares	146
3.3.2. Optimización de las condiciones de formación de los complejos metálicos	147
3.3.3. Validación del método	158
3.3.4. Aplicación a muestras reales	174

<u>3.4. Determinación simultánea de formas químicas de vanadio: Especiación de V(IV) y V(V)</u>	175
3.4.1. Aditividad de las absorbancias de complejos de vanadio	176
3.4.2. Análisis de mezclas sintéticas	177
3.4.3. Estabilidad de los complejos	178
3.4.4. Verificación del método de especiación	179

<u>CAPÍTULO 3. MONITORIZACIÓN DE VANADIO EN ECOSISTEMAS ACUÁTICOS MEDIANTE EL ACOPLAMIENTO DE SISTEMAS DE FLUJO Y TÉCNICAS DE MEMBRANAS LÍQUIDAS</u>	181
---	-----

1. INTRODUCCIÓN	184
1.1. Sistemas de Análisis de Vanadio por Inyección en Flujo (FIA)	185
1.2. Sistemas de Preconcentración: Membranas Líquidas	186
2. DESARROLLO EXPERIMENTAL	189
2.1. <u>Método Automatizado para el Análisis de Vanadio en Continuo (FIA)</u>	189
2.2. <u>Determinación de Trazas de Vanadio en Aguas Naturales mediante Preconcentración con Membranas Líquidas</u>	190
2.1.1. Ensayos Preliminares	190

2.1.2. Oxidabilidad del vanadio	191
2.1.3. Optimización del sistema de membrana líquida	191
2.1.4. Aplicación a muestras reales	192
3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	193
3.1. <u>Método Automatizado para el Análisis de Vanadio en Continuo (FIA)</u>	193
3.1.1. Ensayos Preliminares	193
3.1.2. Pre-optimización Univariante	194
3.1.3. Optimización Multivariante mediante el Método Símplex Modificado	198
3.2. <u>Determinación de Trazas de Vanadio en Aguas Naturales mediante Preconcentración con Membranas Líquidas</u>	203
3.2.1. Ensayos Preliminares	205
3.2.2. Oxidabilidad del vanadio	207
3.2.3. Optimización del sistema de membrana líquida	209
3.2.4. Aplicación a muestras reales	225
 <u>CAPÍTULO 4. NUEVOS SISTEMAS QUÍMICOS PARA LA PRECONCENTRACIÓN DE TRAZAS DE COBRE EN MUESTRAS ACUOSAS. IMPLEMENTACIÓN AL ANÁLISIS ON-LINE</u>	229
 1. INTRODUCCIÓN	233
 2. DESARROLLO EXPERIMENTAL	241
2.1. <u>Método de Determinación en Continuo</u>	241
2.2. <u>Método de Determinación por Preconcentración</u>	243
2.3. <u>Método de Preconcentración por Técnicas Extractivas Mediante el uso de 1,2-CHBBH</u>	244
2.3.1. Ensayos Preliminares	245

2.3.2. Extracción de cobre	246
2.3.3. Reextracción de cobre	246
2.3.4. Aplicación	247
2.3.5. Utilización de 1,2-CHBBH como transportador de cobre en sistemas de membranas líquidas	247
3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	249
3.1. <u>Método de Determinación en Continuo</u>	249
3.1.1. Optimización Univariante	249
3.1.2. Optimización Multivariante mediante el Método Símplex Modificado	253
3.1.3. Validación del método	258
3.1.4. Aplicación	262
3.2. <u>Método de Determinación por Preconcentración</u>	263
3.2.1. Estudios Preliminares	263
3.2.2. Optimización Univariante	266
3.2.3. Optimización Multivariante mediante el Método Símplex Modificado	270
3.2.4. Validación del método	273
3.2.5. Sistema de Membrana Líquida de Volumen	276
3.3. <u>Método de Preconcentración por Técnicas Extractivas mediante el uso de 1,2-CHBBH</u>	279
3.3.1. Ensayos Preliminares	279
3.3.2. Extracción de cobre	280
3.3.3. Reextracción de cobre	295
3.3.4. Aplicación	298
3.3.5. Utilización de 1,2-CHBBH como transportador de cobre en sistemas de membranas líquidas	299
CONCLUSIONES	305
ANEXOS	311

OBJETIVOS DE LA TESIS

OBJETIVOS E INTERÉS DE LA TESIS

En las últimas décadas ha aumentado notablemente el interés por la conservación del medioambiente desde todos los estratos de la sociedad: gobiernos, organizaciones internacionales, etc. Esto ha conllevado que se establezcan criterios que permiten evaluar la calidad de un determinado ecosistema. En este sentido, se han dictado numerosas normativas en las que se recogen no sólo los contenidos máximos tolerables de un gran número de sustancias, a partir de los cuales pueden considerarse tóxicas para un determinado ecosistema, sino también las técnicas de análisis que deben emplearse.

Actualmente, la mayoría de los países disponen de una legislación, cada vez más restrictiva, en la que se establecen los criterios para considerar si un determinado ecosistema se encuentra o no contaminado. Además, se establecen protocolos de actuación en aquellos casos en los que se detecten posibles desastres ecológicos, como por ejemplo, el cercano desastre minero de Aznalcóllar. Para que las medidas a adoptar surtan efecto del modo más eficaz posible sería adecuado disponer en determinados casos de metodologías analíticas que fueran sencillas, rápidas y fiables. En determinadas ocasiones sucede lo contrario, es necesario recurrir al empleo de instrumentación compleja y costosa, la cual es difícilmente transportable hasta el propio lugar de muestreo. Por tanto, sería adecuado disponer de metodologías alternativas en las que fuera posible emplear instrumentos portátiles, que se pudieran transportar hasta el propio lugar de muestreo, para obtener respuestas más rápidas, pero sin renunciar a los niveles de selectividad y sensibilidad requeridos.

En el estudio que se presenta a continuación nos hemos centrado en el análisis de muestras acuosas naturales y, más concretamente, en los metales traza, tratando de alcanzar los siguientes objetivos:

- 1º. Desarrollar métodos analíticos sencillos, rápidos y fiables para la determinación de los contenidos de cobre, cinc y vanadio en muestras acuosas naturales. En este sentido, se ha seleccionado como técnica analítica la

espectrofotometría UV/visible debido a su sencillez, robustez y fácil disponibilidad de instrumentación portátil.

2º. Diseñar estrategias de automatización de los métodos espectrofotométricos desarrollados mediante el Análisis por Inyección en Flujo (FIA), con el propósito de:

- a.** Reducir el consumo tanto de muestras como de reactivos.
- b.** Evitar posible contaminación de las muestras como consecuencia de su manipulación durante su transporte y conservación.
- c.** Aumentar el número de muestras analizadas, lo que permitirá disponer de mayor cantidad de información en menos tiempo.
- d.** Poder utilizar estos métodos como sistemas de cuantificación analítica en análisis de campo automático (análisis *on-line*).

3º. Diseñar y desarrollar sistemas de preconcentración para los elementos en estudio, en particular, para muestras salinas, en las que sus concentraciones ambientales suelen ser bajas, mediante sistemas de membrana líquida de volumen (MLV), al objeto de poder conseguir niveles de sensibilidad similares a los proporcionados por técnicas instrumentales más complejas y costosas.

4º. Acoplar de modo simple y eficaz los sistemas de preconcentración de los metales estudiados a los sistemas FIA que se han desarrollado previamente, con objeto de aumentar la sensibilidad de las determinaciones cuantitativas.

5º. Elaborar un nuevo método de extracción líquido-líquido para cobre en muestras salinas empleando un reactivo sintetizado por el grupo, el 1,2-ciclohexanodiona bis-benzoílhidrazona (1,2-CHBBH), y verificar su posible utilidad como agente transportador de cobre en agua salina con un sistema de membrana líquida de volumen.

III

6º. Buscar nuevas alternativas a los sistemas de preconcentración de cobre en aguas salinas mediante MLV existentes. En este sentido, mediante el uso de nuevos reactivos y diseños, alcanzar mejoras tales como:

- a.** Reducir el tiempo de preconcentración necesario.
- b.** Emplear una técnica simple para su determinación, como la espectrofotometría UV/visible.
- c.** Utilizar otros agentes transportadores alternativos, como 1,2-CHBBH.

CAPÍTULO 1. INTRODUCCIÓN

- 1. INTRODUCCIÓN**
- 2. LOS METALES PESADOS ESTUDIADOS**
 - 2.1. Cobre**
 - 2.2. Cinc**
 - 2.3. Vanadio**
- 3. DETERMINACIÓN DE METALES**
 - 3.1. Métodos de análisis de cobre en aguas naturales**
 - 3.1.1. Complejos orgánicos coloreados de cobre**
 - 3.1.2. Otros Métodos**
 - 3.2. Métodos de análisis de cinc en aguas naturales**
 - 3.2.1. Complejos orgánicos coloreados de cinc**
 - 3.2.2. Otros Métodos**
 - 3.3. Métodos de análisis de vanadio en aguas naturales**
 - 3.3.1. Complejos orgánicos coloreados de vanadio**
 - 3.3.2. Otros Métodos**
- 4. SEPARACIÓN DE METALES. MEMBRANAS LÍQUIDAS**
 - 4.1. Sistemas de membranas líquidas**
 - 4.1.1. Tipos de membranas líquidas**
 - 4.1.2. Variables que determinan el transporte**

1. INTRODUCCIÓN

El creciente interés despertado por el estudio de metales pesados en muestras medioambientales en las últimas décadas puede entenderse, por una parte, teniendo en cuenta la alta toxicidad que presentan muchos de ellos, y por otra, su elevada persistencia, pudiendo sintetizarse en la idea expresada por Nriagu y Paycna, en la que declaraban que *“el considerable aumento de la circulación de metales tóxicos a través del suelo, agua y aire, se ha convertido en un asunto medioambiental que entraña riesgos desconocidos para las generaciones venideras”*¹.

Aunque, en muchos casos, la presencia de metales pesados en el medioambiente tiene un origen natural, su exceso suele venir relacionado fundamentalmente con el aumento de los residuos generados por las distintas actividades desarrolladas por el hombre. Así, las aguas residuales urbanas, industriales, agrícolas, etc., contienen grandes cantidades de metales pesados en comparación con sus niveles naturales.

¹ Nriagu, J.O.; Paycna, J.M. Quantitative assessment of worldwide contamination of air, water and soils by trace metals. *Nature*, 333, 134, 1988.

CAPÍTULO 1

Cuando éstas llegan hasta el mar arrastradas por los ríos, los metales pesados pueden incorporarse a la cadena trófica a través de los distintos microorganismos presentes en el ecosistema pudiendo llegar hasta el hombre y provocar efectos perjudiciales en la salud e incluso la muerte. En este sentido, en la tabla 1 se muestran distintos episodios de envenenamiento por metales que llegaron a provocar mortalidad de seres humanos.

Tabla 1. Ejemplos de algunos episodios de envenenamiento por metales².

Metal	Forma química	Lugar	Población afectada	Fuente de contaminación	Año
Hg	Metil-Hg	Bahía de Minamata (Japón)	Pescadores y familias	Efluente industrial	1953
Hg	Metil-Hg	Niigata (Japón)	Pescadores y familias	Efluente industrial	1964-65
Hg	Fungicida	Irak	Granjeros y familias	Semillas de trigo	1972
Cd	Cd	Toyama (Japón)	General	Mina de cinc	1947
Pb	PbCrO ₄	Hong Kong	Soldados británicos	Especia (curry)	1969
Cu	CuSO ₄	Scheveningen (Holanda)	Peces	Cristales de CuSO ₄	1972
Cr	Cr (III) y Cr (VI)	Hokkaido (Japón)	Trabajadores	Inhalación de gases	1960

Por tanto, el análisis de metales pesados en el agua de mar resulta de gran interés en los campos de la química, geología, biología, toxicología, ecología, física, medio ambiente, etc., así como para las autoridades y en muchos sectores productivos. Aunque existen gran cantidad de alternativas analíticas para la práctica totalidad de los elementos, en la mayoría de los casos los análisis suelen ser complejos y de elevado coste económico. Esto es debido a la complejidad que presenta la matriz de la muestra y a las bajas concentraciones en las que suelen estar presentes estos metales. Esta situación es especialmente significativa en el caso de muestras marinas. Así, por ejemplo, en aguas oceánicas las concentraciones que habitualmente se encuentran para algunos metales de interés son las siguientes: Al (0,1 – 1 µg·L⁻¹), Fe (5 – 140 ng·L⁻¹), Cu

² Förstner, U.; Wittmann, G.T.W. *Metal Pollution in the Aquatic Environment*, Ed. Springer-Verlag, Berlín. 1979.

(0,03–0,38 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$), Pb (1,04 – 36,26 $\text{ng}\cdot\text{L}^{-1}$), Cd (0,11 – 124 $\text{ng}\cdot\text{L}^{-1}$), V (1 – 1,8 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) y Zn (3,27 – 588 $\text{ng}\cdot\text{L}^{-1}$)³. En el caso de las aguas costeras y de los estuarios las concentraciones pueden ser muy variables, aunque algo mayores que las anteriores. Por ejemplo, el Cu puede variar entre 0,2 – 100 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, el Cd entre 1 – 100 $\text{ng}\cdot\text{L}^{-1}$, el Zn puede alcanzar valores superiores a 100 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, etc.⁴

De lo mencionado hasta aquí resulta evidente que para poder determinar niveles de concentración tan bajos ha sido necesario desarrollar métodos analíticos con elevada sensibilidad. Este hecho está íntimamente relacionado con la complejidad del método analítico que se ha de utilizar ya que, habitualmente, cuanto mayor sea la sensibilidad requerida para llevar a cabo el análisis más complejo llega a ser éste. En este sentido, las técnicas espectroscópicas analíticas que más se han utilizado han sido la espectroscopía de absorción atómica con atomización electrotérmica (GFAAS) y, en estos últimos años, la espectrometría de masas con plasma acoplado inductivamente (ICP-MS). En la primera, antes de analizar las muestras, es necesario realizar protocolos de preconcentración muchas veces basados en la extracción con ditiocarbamato y, habitualmente, el empleo de la adición de estándar⁵. En el caso de la segunda, el principal inconveniente que presenta es la baja tolerancia de la interfase Plasma-Masas a altos contenidos de sólidos disueltos, por lo que las muestras deben ser diluídas⁶ o sometidas a un proceso de separación, por ejemplo, cambio iónico⁷, antes de su introducción. También se han empleado técnicas electroquímicas, las cuales, si bien pueden tener suficiente sensibilidad para ser aplicadas a las aguas marinas directamente para determinar metales pesados, presentan el inconveniente de que los métodos desarrollados sólo son aplicables a unos pocos metales, como Cu, Zn, Cd, Pb, etc.

Aunque son numerosas y bien conocidas las ventajas de estas técnicas analíticas avanzadas, también presentan algunos inconvenientes, como los ya mencionados, que

³ Millero, F. *Chemical Oceanography*, CRC Press, Boca Ratón, 1996.

⁴ Kennish, M.J., *Practical Handbook of Estuarine and Marine Pollution*, CRC Press, Boca Ratón, 1997.

⁵ Bruland, K.W.; Cole, K.H.; Mart, L. Analysis of seawater for dissolved cadmium, copper and lead: an intercomparison of voltammetric and atomic absorption methods. *Mar. Chem.*, 17, 285, 1985.

⁶ Louie, H.; Wu, M.; Di, P.; Snitch, P.; Chapple, G. Direct determination of trace elements in sea-water using reaction cell inductively coupled plasma mass spectrometry. *J. Anal. At. Spectrom.*, 17, 587, 2002.

⁷ Hirata, S.; Ishida, Y.; Aihara, M.; Honda, K.; Shikino, O. Determination of trace metals in seawater by on-line column preconcentration inductively coupled plasma mass spectrometry. *Anal. Chim. Acta*, 438, 205, 2001.

CAPÍTULO 1

implican manipulación de las muestras y, por tanto, riesgo de posible contaminación de éstas o pérdida de analitos. Por otro lado, otro factor importante a considerar es el económico. Así, en los métodos espectroscópicos citados se necesita un elevado coste de mantenimiento para garantizar su adecuado funcionamiento y, en el caso de ICP-MS, una fuerte inversión para su adquisición. Esto contribuye a que no sean muy numerosos los grupos de investigación que disponen de este tipo de instrumentación y, por tanto, se desarrollen métodos analíticos alternativos que sean rápidos, sencillos y económicos. Por otra parte, y dado que cada vez está siendo más habitual la necesidad de disponer de metodologías que puedan emplearse en los análisis de las muestras *in situ* y *on-line*, resulta bastante complicado que estas técnicas puedan emplearse. Es, en este momento, cuando técnicas analíticas más sencillas como la espectroscopía UV/visible o la espectrofluorimetría adquieren un papel importante. En ambos casos se trata de técnicas muy simples, con escaso coste de mantenimiento y cuya instrumentación puede transportarse fácilmente hasta el propio lugar en el que se va a realizar la toma de muestras. Esto supone una ventaja con respecto a los posibles riesgos de contaminación que puedan producirse en las etapas de transporte y conservación de las mismas hasta que llegan al laboratorio.

Evidentemente, estas técnicas presentan como principal desventaja que en muchos casos no alcanzan los límites de detección requeridos. En estos casos, igual que con otras técnicas espectroscópicas más sensibles, es necesario llevar a cabo un paso previo de preconcentración para poder efectuar el análisis, siendo el cambio iónico y la extracción líquido-líquido las técnicas que se utilizan mayoritariamente. No obstante, este proceso implica una manipulación importante de la muestra, por lo que sería adecuado disponer de alternativas que evitaran en lo posible dicha manipulación. Una de las que mayor profusión está adquiriendo es la utilización de las membranas líquidas. Éstas son, esencialmente, como veremos, una barrera líquida que separa dos disoluciones inmiscibles con ella y a través de la cual se realiza un transporte de especies químicas. Este transporte tiene lugar mediante la simultaneidad de los procesos de extracción y reextracción. Es decir, nos encontramos ante un proceso cinético, en el

cual, a diferencia de los procesos de extracción líquido-líquido, no llega a alcanzarse el equilibrio entre las distintas especies que intervienen en el proceso^{8,9}.

En el trabajo que aquí se presenta se han tratado de cumplir los requisitos mencionados anteriormente, es decir, desarrollar metodologías analíticas sencillas, económicas y con posibilidad de utilización en controles de campo y de campo automático para el análisis de metales pesados en muestras acuosas. La elección de la espectroscopía UV/visible como técnica de medida se ha basado en la sencillez, robustez y facilidad de manejo que presenta, así como en la posibilidad de disponer de instrumentos portátiles que pueden transportarse fácilmente hasta el lugar en el que se encuentra la población objetivo.

Por otro lado, para aquellos casos en los que fuera necesaria la preconcentración del metal, se han seleccionado las membranas líquidas de volumen, utilizando como agentes extractantes reactivos orgánicos adecuados, en orden a una fácil automatización del método y a una prevención de la contaminación del analito.

2. LOS METALES PESADOS ESTUDIADOS

El término *metal pesado* se ha venido utilizando en la literatura científica desde hace unos setenta años para referirse a una serie de elementos metálicos con determinadas características comunes. Actualmente, se reconocen como tales a aquellos elementos metálicos que son potencialmente tóxicos para el medioambiente. No obstante, a lo largo de este período han sido muchas las definiciones que se han utilizado para su clasificación, como se recoge en el artículo publicado por Duffus¹⁰. En éste, el autor concluye que “*El término ‘metal pesado’ nunca se ha definido por ninguna autoridad tal como la IUPAC.*”, existiendo gran confusión debido al “*número tan amplio de definiciones aportadas por los distintos autores*”.

⁸ Noble, R.D.; Way, J.D. *Liquid Membranes. Theory and Applications*. ACS Symposium Series 347, ACS, Washington, 1987.

⁹ Bartsch, R.A.; Way, J.D. *Chemical Separations with Liquid Membranes*. ACS Symposium Series 642, ACS, Washington, 1996.

¹⁰ Duffus, J.H. ‘Heavy Metals’ - A Meaningless Term. *Pure Appl. Chem.*, 74, 793, 2002.

CAPÍTULO 1

Además, la potencial toxicidad de un elemento metálico dado está más relacionada con alguna de las formas químicas en las que pueda encontrarse que con el conjunto de todas las formas químicas que conforman el propio metal como tal. Como ejemplo podemos citar el caso del cromo, el cual presenta una toxicidad aproximadamente cien veces superior cuando se encuentra formando compuestos en estado de oxidación +6 que cuando lo hace en estado de oxidación +3.

Para efectuar los trabajos que forman la presente memoria, de entre los diferentes elementos metálicos que pueden considerarse, se seleccionaron cobre, cinc y vanadio. La elección de éstos se basó fundamentalmente en las características biogénicas que presentan. En este sentido, tanto cobre como cinc se consideran elementos esenciales, ya que son necesarios para el normal desarrollo y crecimiento del hombre, animales y plantas. Por otro lado, aunque no se ha demostrado la esencialidad del vanadio para el hombre, éste se encuentra entre los deseables, además se ha demostrado que es un elemento esencial en las ascidias¹¹. Así, a pesar de que estos elementos pueden considerarse en sentido lato esenciales, son también elementos tóxicos cuando sus concentraciones sobrepasan determinados valores umbrales que afectan negativamente al desarrollo metabólico de los seres vivos.

A continuación se va a realizar una breve descripción de los elementos metálicos que se han elegido para realizar el presente estudio.

2.1. Cobre. El cobre es el primer elemento del grupo once del Sistema Periódico. Sus propiedades físicas y químicas tales como elevada conductividad térmica, alta conductividad eléctrica, maleabilidad, baja corrosión, capacidad para formar aleaciones y abundancia, lo convierten en uno de los metales más importantes. Es de color rojizo, encontrándose tanto en suelos, rocas, aguas, sedimentos y aire como en todos los animales y las plantas.

Su configuración electrónica externa es $3d^{10}4s^1$, siendo los estados de oxidación habituales uno y dos. En disolución el estado de oxidación estable es dos y se encuentra

¹¹ Furness, R.W.; Rainbow, P.S. *Heavy Metals in the Marine Environment*. CRC Press, Boca Raton, 1990.

rodeado octaédricamente por seis moléculas de agua. La mayoría de los compuestos y complejos que forma son azules o verdes y habitualmente solubles en agua.

En la corteza terrestre presenta una concentración media de $50 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$, siendo los minerales más importantes: calcocita (Cu_2S), calcopirita (CuFeS_2) y malaquita ($\text{CuCO}_3\cdot\text{Cu}(\text{OH})_2$), aunque también aparece en otros minerales como cuprita (Cu_2O), azurita ($2\text{CuCO}_3\cdot\text{Cu}(\text{OH})_2$) y bornita (Cu_5FeS_4). En ríos y lagos su concentración media se encuentra en torno a los $4 \text{ }\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, mientras que en el agua de mar está en torno a $0,15 \text{ }\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ y puede llegar a $200 \text{ ng}\cdot\text{L}^{-1}$ en el aire¹².

En los organismos vivos, incluyendo el hombre, se considera un elemento esencial, ya que participa en un gran número de procesos biológicos como el transporte de oxígeno, actividades redox (transporte de electrones) y como cofactor de enzimas o metaloenzimas¹¹. Además, se encuentra normalmente en todos los tejidos del cuerpo humano, en la sangre, la orina, las heces, el cabello y las uñas. También se encuentra de manera natural en la dieta, tanto en los alimentos como en el agua, estimándose un consumo medio de un miligramo de cobre al día. No obstante, una ingesta excesiva de éste puede provocar efectos tóxicos en los organismos, ya que puede inhibir la actividad enzimática y afectar al funcionamiento normal de células, tejidos y órganos¹¹. En el caso del hombre, los efectos adversos sobre la salud se manifiestan por daños en el hígado y el riñón, anemia, inmunotoxicidad, etc., aunque los más habituales suelen ser los trastornos gastrointestinales, que se manifiestan por vómitos, náuseas y dolor abdominal poco después de ingerir bebidas con contenidos elevados de cobre. Además, y dada la esencialidad de este elemento para el organismo, su deficiencia también puede provocar algunas enfermedades como anemia, osteoporosis o niveles altos de colesterol¹³. Por tanto, es necesario que se mantenga una concentración de cobre prácticamente constante en el organismo para que no se produzcan efectos sobre la salud. Por último, para determinar si un individuo se encuentra afectado por cobre no sólo habrá que tener en cuenta factores como la dosis, la duración y el tiempo de

¹² Eisler, R. *Cap. 3. Copper en Handbook of chemical risk assessment. Health hazards to humans, plants and animals. Vol. 1.* CRC Press, Boca Raton, 2000.

¹³ Departamento de Salud y Servicios Humanos de EE.UU. Agencia para sustancias tóxicas y el registro de enfermedades (ATSDR) en <http://www.atsdr.cdc.gov/toxprofiles/tp132.html>

CAPÍTULO 1

exposición, sino también otros factores como el contacto con otros agentes químicos, la edad, la dieta, el sexo, el estilo de vida o el estado de salud.

Como ya se ha mencionado, el cobre se encuentra en todos los compartimentos ambientales de forma natural, por lo que su acumulación a través de la cadena alimentaria debe provenir de su incorporación al medio por otras vías. Esta acumulación se realiza por procesos naturales, como pueden ser las erupciones volcánicas, los incendios forestales (no provocados), el polvo arrastrado por el aire, los restos de fauna y vegetación o la espuma del mar, y por las actividades antropogénicas, entre las más importantes se pueden citar: combustión de residuos y combustibles fósiles, aguas residuales industriales y urbanas, residuos minería, producción de madera, producción de fertilizantes, etc.¹⁴. Cuando el cobre o sus compuestos se emiten al aire, como sucede con las plantas industriales que procesan el mineral de cobre, éste lo hace en forma de partículas que pueden ser arrastradas varios kilómetros desde la fuente de emisión. Posteriormente, estas partículas se depositarán en el suelo debido a la gravedad o a las precipitaciones (lluvia o la nieve), o bien pueden llegar hasta el mar, donde se pueden unir a las partículas suspendidas en el agua, depositándose finalmente en los sedimentos. En el caso de las aguas residuales industriales o urbanas el proceso es similar, ya que se acumula en los sedimentos de los ríos, lagos y estuarios. Una vez que el cobre llega a los sedimentos, si se producen alteraciones en las características físico-químicas del sistema, puede ocurrir que parte de éste se lixivie en el agua y sea absorbido por los distintos microorganismos presentes en el sistema, o sea retenido en forma particulada en el sistema de filtración de los organismos bénticos. Posteriormente, comienza su incorporación a la cadena trófica hasta poder llegar al hombre.

2.2. Cinc. El cinc es el primer elemento del grupo doce del Sistema Periódico y, a diferencia del cobre, no se encuentra libre en la naturaleza debido a su elevada reactividad. El metal es de color blanco azulado, encontrándose en suelos, agua, aire, y en la mayoría de los alimentos.

¹⁴ Wright, D.A. *Environmental Toxicology*. Cambridge University Press, New York, pp 301-304, 2001.

Su configuración electrónica externa es $3d^{10}4s^2$, por lo que sus estados de oxidación más habituales son 0 y +2. En disolución acuosa el catión puede estar rodeado por cuatro o seis moléculas de agua. Forma una gran cantidad de compuestos estables, entre los que destacan los cloruros, los óxidos y los sulfatos. Su comportamiento anfótero le permite mostrar una fuerte tendencia a reaccionar tanto con compuestos ácidos como básicos.

Es uno de los elementos más comunes en la corteza terrestre, con una concentración media de $60 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$. Se conocen más de 50 minerales distintos, pero los más importantes son: esfalerita (ZnS), smithsonita (ZnCO_3) y hemimorfita ($\text{Zn}_4\text{Si}_2\text{O}_7(\text{OH})_2\cdot\text{H}_2\text{O}$). En aguas naturales (ríos y lagos) su concentración oscila entre $0,86$ y $200 \text{ }\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ y entre $0,01$ y $0,62 \text{ }\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ para agua de mar, mientras que oscila entre $0,1$ y $1,7 \text{ }\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ en partículas aéreas¹⁵.

Igual que el cobre, se considera un elemento esencial, ya que participa en un gran número de enzimas presentes en el organismo, encontrándose en todos los tejidos y fluidos biológicos. También se encuentra de manera natural en la dieta, tanto en alimentos como el agua, estimándose un consumo medio de unos 5 mg de cinc al día para mantener su concentración en los niveles apropiados en el cuerpo humano. No obstante, una ingesta excesiva puede provocar efectos adversos sobre la salud que pueden manifestarse por una gran variedad de síntomas, entre los que pueden citarse vómitos, diarreas, dolor abdominal, pérdida de apetito, etc. Por otro lado, su deficiencia también puede provocar trastornos en el organismo, entre los que pueden citarse retraso en el crecimiento, dermatitis, anorexia, pérdida de memoria, etc.¹⁶ En este sentido, es necesario mantener los niveles de concentración de cinc en el organismo dentro de los límites recomendables para evitar sus efectos nocivos sobre la salud.

Como se ha mencionado anteriormente, dado que el cinc se encuentra en todos los compartimentos medioambientales, su acumulación a través de la cadena alimentaria vendrá provocada tanto por factores naturales como antropogénicos. Entre los primeros pueden citarse los incendios forestales (no provocados), las erupciones volcánicas, los

¹⁵ Eisler, R. Cap. 9. Zinc en *Handbook of chemical risk assessment. Health hazards to humans, plants and animals. Vol. 1*. CRC Press, Boca Raton, 2000.

¹⁶ Nordberg, G.F.; Sandström, B.; Becking, G.; Goyer, R.A. *1. Essentiality and toxicity of metals in Heavy Metals in the Environment*. Ed. Marcel Dekker, New York, 2002.

CAPÍTULO 1

aerosoles marinos, la lixiviación de suelos y rocas, etc. Entre los factores antropogénicos, los más importantes, destacan la producción de aceros, las aguas residuales industriales y urbanas, los fertilizantes, insecticidas, fungicidas, cosméticos, pinturas, etc. Su incorporación y acumulación a través de la cadena trófica ocurre de forma similar a la mencionada anteriormente para el cobre.

2.3. Vanadio. El vanadio es el primer elemento del grupo cinco del Sistema Periódico y, como ocurre con el cinc, no se encuentra en estado nativo en la naturaleza. Se trata de un metal de transición blanco, dúctil y brillante que presenta una alta resistencia a las bases, al ácido sulfúrico (H_2SO_4) y al ácido clorhídrico (HCl). Se obtiene de distintos minerales, así como de petróleos. También se puede obtener de la recuperación del óxido de vanadio (V) en polvos procedentes de procesos de combustión. Tiene algunas aplicaciones nucleares debido a su baja sección de captura de neutrones. Es un elemento esencial en algunos seres vivos.

Su configuración electrónica externa es $3d^3 4s^2$, por lo que puede encontrarse en varios estados de oxidación, siendo los más comunes +2, +3, +4 y +5. Forma una gran variedad de oxoaniones polimerizados en disolución, presentando una química tan variable y compleja como la del carbono. En aguas naturales predominan los estados de oxidación superiores (+4 y +5), mostrando mayor toxicidad cuando se encuentra como vanadio (V).

En la corteza terrestre se encuentra con una concentración media de $15 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$, y se conocen alrededor de 70 minerales diferentes, entre los que destacan: patronita (VS_4), vanadinita ($\text{Pb}_5(\text{VO}_4)_3\text{Cl}$) y carnotita ($\text{K}_2(\text{UO}_2)_2(\text{VO}_4)_2\cdot 3\text{H}_2\text{O}$). También aparece en la bauxita, así como en depósitos que contienen carbono, como por ejemplo en carbón, petróleos, crudo y alquitrán. Se extrae del petróleo empleando porfirinas. En aguas naturales presenta una concentración media de $2,5 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, mientras que en el agua de mar se encuentra en torno a $1,5 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ y puede llegar a alcanzar una concentración de hasta $11 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ en el aire¹⁷.

¹⁷ Departamento de Salud y Servicios Humanos de EE.UU. Agencia para sustancias tóxicas y el registro de enfermedades (ATSDR) en <http://www.atsdr.cdc.gov/tfacts58.html>

El vanadio es un elemento esencial en algunos organismos, mientras que en el hombre no está demostrada su esencialidad, aunque existen compuestos de vanadio que imitan y potencian la actividad de la insulina. Se encuentra en algunas enzimas de distintas plantas y microorganismos, como por ejemplo, en las haloperoxidasas (generalmente bromoperoxidasas) de algunas algas, que reducen peróxidos y a la vez halogenan un sustrato orgánico. Las ascidias (unos organismos marinos de la familia de los tunicados) almacenan altas concentraciones de vanadio, alrededor de un millón de veces más altas que el agua que les rodea, encontrándose en una molécula llamada *hemovanadina*. En estos organismos el vanadio se almacena en unas células llamadas *vanadocitos*.

Se encuentra de manera natural en la dieta, tanto en alimentos como en el agua, estimándose un consumo medio de 1,8 mg/día. Debido a su escasa absorción en el tracto gastrointestinal se excreta fácilmente por la orina y las heces. Los efectos adversos sobre la salud humana se manifiestan fundamentalmente como consecuencia de su inhalación más que por ingestión, acumulándose en los pulmones¹⁸. Entre los síntomas más frecuentes pueden mencionarse: tos, respiración ruidosa, dolor de pecho, etc. También se ha relacionado su elevada concentración en el plasma humano con enfermedades maníaco-depresivas.

Como se ha indicado anteriormente, los niveles más altos de concentración se encuentran en el aire, debido tanto a fuentes naturales como antropogénicas. Entre las primeras se pueden citar las emisiones volcánicas, los aerosoles marinos y la lixiviación de suelos. En el caso de las fuentes antropogénicas, destaca la combustión de combustibles fósiles ricos en vanadio, como petróleo, crudos, etc. En los sistemas acuáticos, la mayor parte de vanadio se encuentra de manera natural como consecuencia de la lixiviación de suelos, aunque también puede incorporarse a estos sistemas por deposición de las partículas aéreas, el tratamiento de suelos ricos en vanadio y los vertidos directos.

¹⁸ Wright, D.A. *Environmental Toxicology*. Cambridge University Press, New York, pp. 344-346, 2001.

3. DETERMINACIÓN DE METALES

Para determinar los contenidos de elementos metálicos en cualquier tipo de muestra nos encontramos en la bibliografía con muchos métodos de análisis que abarcan desde los clásicos (como volumetrías o gravimetrías) hasta los instrumentales más complejos. Si se restringe el tipo de muestra a las medioambientales, el resultado es similar. En este apartado se describirán brevemente los diferentes métodos analíticos disponibles para el análisis de cobre, cinc y vanadio en aguas naturales.

En los trabajos experimentales realizados, y que se expondrán en capítulos posteriores, la técnica instrumental que se ha utilizado mayoritariamente ha sido la espectrofotometría, por lo que se realizará una reseña más exhaustiva de los métodos espectrofotométricos encontrados en la bibliografía para el análisis de los elementos de interés. Igualmente, se mencionarán algunos ejemplos de trabajos representativos de otras técnicas instrumentales que también se han empleado para el análisis de estos elementos en aguas naturales.

3.1. Métodos de Análisis de Cobre en Aguas Naturales

Puesto que el contenido de cobre en aguas naturales se encuentra generalmente en niveles de concentración de ppb, ha sido necesario desarrollar métodos analíticos con precisión y exactitud que fueran lo suficientemente sensibles como para permitir su análisis a dichas concentraciones. En muchas ocasiones, ha sido necesario introducir un paso previo de separación/preconcentración para poder efectuar el análisis. A continuación, se describirán, en primer lugar, los métodos espectrofotométricos más recientes para la determinación de cobre en aguas naturales. En un apartado posterior se citarán ejemplos de los trabajos más representativos para el análisis de este elemento utilizando otras técnicas instrumentales como las electroquímicas (voltamétricas, fundamentalmente), espectroscópicas (absorción atómica de llama y electrotérmica así como emisión en plasma) y otras técnicas menos habituales.

3.1.1. Complejos orgánicos coloreados de cobre. Esta técnica ha sido una de las más ampliamente utilizadas para la determinación de metales traza debido a su simplicidad, fácil manejo y posibilidad de disponer de instrumentación portátil que puede

transportarse fácilmente y usarse en controles de campo y campo automático. En la mayoría de las ocasiones los métodos espectrofotométricos están basados en la formación de compuestos coloreados mediante la reacción del ión metálico con un reactivo adecuado. El principal inconveniente que presentan es que en muchos casos se alcanzan límites de detección superiores a los niveles de concentración en los que se encuentran los analitos en las muestras. Aunque otras técnicas espectroscópicas tales como la absorción atómica de llama (FAAS), en horno de grafito (GFAAS) o emisión en plasma acoplado inductivamente (ICP-AES), son más sensibles y selectivas para la determinación de cobre en aguas naturales que los métodos colorimétricos, presentan entre otros, algunos inconvenientes:

- 1°. La instrumentación es cara.
- 2°. Tienen un elevado coste de operación y mantenimiento.
- 3°. Difícilmente transportables hasta el propio lugar de muestreo.

Por tanto, los métodos espectrofotométricos se presentan en algunos casos como una clara alternativa para la determinación de elementos traza en aguas naturales, sobre todo en aquellos en los que se requieren resultados con prontitud. Además, si se seleccionan adecuadamente tanto el ligando como las condiciones de reacción, es posible alcanzar límites de detección similares o incluso mejores a los que se obtienen con las técnicas espectroscópicas mencionadas anteriormente. De ahí que hoy día, y como uno de los objetivos de este estudio, se sigan desarrollando este tipo de metodologías. En el caso del cobre, se encuentran en la bibliografía una gran variedad de ligandos clásicamente utilizados para su determinación espectrofotométrica, tales como la ditizona, el ditiocarbamato, la cuproína y la cuprizona.¹⁹ A continuación, se mencionarán más detalladamente algunos ejemplos de métodos analíticos recientes para la determinación espectrofotométrica de cobre en aguas naturales. En este instante es preciso señalar que la presentación de los mismos se realizará en función de su grado de automatización, por lo que se agruparán como métodos en discontinuo y métodos en continuo (FIA). Este mismo criterio será empleado para los otros dos elementos seleccionados, cinc y vanadio.

¹⁹ Marzenko, Z. *Spectrophotometric determination of elements. Capítulo 19*. John Wiley & Sons Inc., New York, 1976.

CAPÍTULO 1

Métodos Discontinuos

Métodos Directos

En primer lugar, se indicarán las características más importantes de algunos métodos espectrofotométricos basados en la reacción de cobre con el reactivo cromogénico y su posterior medida. Así, Dong y col. han utilizado la reacción de cobre (II) en un medio regulado a pH 3,4 con N-fenil-N'-sulfanilato sódico/tiourea para su determinación espectrofotométrica en diferentes tipos de muestras, incluyendo muestras acuosas²⁰. La absorptividad molar del método es elevada, $1,79 \cdot 10^5 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$, y la ley de Beer se cumple para el intervalo de concentración de 40 a 2200 $\mu\text{g/L}^{-1}$ de Cu^{2+} . Sin embargo, no se indica nada respecto de las posibles interferencias causadas por la presencia de otros iones. Posteriormente, Jamaluddin y col. han utilizado el reactivo 2,5-dimercapto-1,3,4-tiadiazol (DMTD) para determinar cobre en muestras de orígenes diferentes²¹. En esta ocasión, la reacción tiene lugar en un medio ligeramente ácido y es instantánea, permaneciendo estable la absorbancia durante 24 horas. El complejo Cu(II)-DMTD absorbe a 390 nm, con un coeficiente de absorptividad molar de $5,65 \cdot 10^4 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ y un intervalo de linealidad de 0,1-20 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$. Para eliminar las posibles interferencias adicionan distintos agentes enmascarantes, como tartrato, fluoruro, citrato y 1,10-fenantrolina. Recientemente, Alieva y col. han empleado el reactivo 2,2',3,4-tetrahidroxi-3'-sulfo-5-cloroazobenceno para determinar cobre en muestras de suelos y aleaciones²². La reacción tiene lugar a pH 2, obteniéndose un complejo de estequiometría 1:1 que absorbe a 510 nm. En estas condiciones, los autores obtuvieron un valor de $3,6 \cdot 10^4 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ para el coeficiente de absorptividad molar y un rango de linealidad de 0,1-2,8 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$. También se han utilizado las reacciones de formación de complejos de transferencia de carga. Como ejemplo, se puede citar el complejo formado

²⁰ Dong, Y.; Wang, Y.; Ma, D. Highly sensitive and selective methods for identifying and determining copper (II) with N-phenyl-N'-sodium sulfanilate thiourea. J. Inor. Biochem., 67, 381, 1997.

²¹ Jamaluddin, M.; Vahan, I.; Banoo, S. A simple spectrophotometric method for the determination of copper in industrial, environmental, biological and soil samples using 2,5-dimercapto-1,3,4-thiadiazole. Anal. Sci., 18, 805, 2002.

²² Alieva, R.A.; Gadzhieva, S.R.; Guseinli, A.G.; Alieva, T.I. Tetrahydryazon SCl as a new analytical reagent for determining copper (II). J. Anal. Chem., 63 (1), 21, 2008.

por 3,3',5,5'-tetrametilbencidina (TMB) con cobre(II)²³. La formación del complejo tiene lugar cuando a la disolución que contiene el analito se le adiciona ácido acético, volframato sódico, fosfato ácido de sodio y alcohol polivinílico y después de agitar se adiciona el reactivo, TMB. Tras mantener la disolución en un baño de agua hirviendo durante 15 minutos y dejar enfriar, se mide la absorbancia a 660 nm en celdas de 2 cm de camino óptico. El valor de absortividad molar es elevado, $2,54 \cdot 10^5 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$, y el intervalo de linealidad es $0,003\text{-}0,1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$. Recientemente, Gao y col. han desarrollado un nuevo método basado en la decoloración del cromóforo mediante radicales libres (CDFR)²⁴. Para ello, los autores utilizan los radicales hidroxilos generados a partir de la reacción Fenton (reacción entre hierro y peróxido de hidrógeno) para provocar la decoloración del exceso de reactivo (un fenilazo derivado del ácido cromotrópico, ACDB) tras la formación del correspondiente complejo con el analito. De este modo, el color que presenta la disolución procede únicamente del complejo formado, lo que permite cuantificar la concentración del analito. El proceso tiene lugar a pH 5,07 presentando el complejo un valor de absortividad molar de $3,33 \cdot 10^4 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ a 540 nm y un intervalo de linealidad para cobre de $0\text{-}0,5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$. El límite de detección que alcanzan es de $6 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$.

En otras ocasiones, se han desarrollado otros métodos para determinar cobre que están basados en la formación de complejos ternarios. Habitualmente, se adiciona un compuesto tensioactivo con el objeto de mejorar la sensibilidad y/o selectividad del método. En este sentido, Zaki y col., estudiaron dos sistemas ternarios diferentes para la determinación de cobre en distintos tipos de muestras²⁵. En ambos casos se han utilizado derivados arílicos de la rodamina como reactivos cromogénicos: 5-[(4-hidroxi-3-metoxifenil)metilen]-2-tioxo-4-tiazolidina (HMBR) y 5-[(3,4-dihidroxifenil)metilen]-2-tioxo-4-tiazolidina (3,4-DHBR). Para aumentar la sensibilidad de los complejos formados adicionan un tensioactivo catiónico, el bromuro de cetiltrimetil amonio

²³ Di, J.; Wu, Y.; Ma, Y. A novel spectrophotometric determination of copper based on charge transfer complex. *Spectrochim. Acta, Part A*, 61, 937, 2005.

²⁴ Gao, H.W.; Chen, F.F.; Chen, L.; Zeng, T.; Pan, L.T.; Li, J.H.; Luo, H.F. A novel detection approach based on chromophore-decolorizing with free radical and application to photometric determination of copper with acid chrome dark blue. *Anal. Chim. Acta*, 587, 52, 2007.

²⁵ Zaki, T.; Abdel-Rahman, R.M.; El-Sayed, A.Y. Use of arylidenrhodanines for the determination of Cu(II), Hg(II) and CN^- . *Anal. Chim. Acta*, 307, 127, 1995.

CAPÍTULO 1

(CTAB), y un coloide protector, la polivinilpirrolidina (PVP). El complejo ternario formado por Cu(II)-HMBR-PVP a pH entre 9,7-10,6 presenta un máximo de absorbancia a 535 nm, con un valor de absorptividad molar de $4,55 \cdot 10^4 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ y un intervalo de linealidad de $0,08\text{-}1,42 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$. El límite de detección de cobre alcanzado por este método era $0,032 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$. Con el otro sistema ternario, Cu(II)-3,4-DHBR-CTAB, obtuvieron valores para el coeficiente de absorptividad molar así como para el límite de detección ligeramente mejores, $5,41 \cdot 10^4 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ y $0,027 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, respectivamente. En esta ocasión, el intervalo de linealidad era $0,06\text{-}1,20 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$. Un límite de detección similar, $0,021 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, se indica en los trabajos realizados por Ghazy y col.²⁶. Los autores utilizan la acetofenona-p-clorofeniltiosemicarbazona (A-p-CIPT) como reactivo y el ácido oléico (HOL) como agente tensioactivo. El intervalo de concentración de cobre en el que se cumple la ley de Beer es de $0,25\text{-}6,35 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, mientras que la absorptividad molar vale $1,3 \cdot 10^4 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ a 600 nm. Otro ejemplo de la formación de complejos ternarios ha sido realizado por Fu y Yuan, en el que forman el complejo de cobre con 4,4'-bis(dimetilamino)tiobenzofenona (TMK) y octil fenil eter (OP) como tensioactivo²⁷. El complejo formado presentaba un máximo de absorbancia a 500 nm con un coeficiente de absorptividad molar de $5,7 \cdot 10^4 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$. La ley de Beer se cumple hasta $0,6 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ de Cu(II) y el límite de detección que obtuvieron fue de $0,4 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$.

Métodos catalíticos

Estos métodos hacen uso del efecto catalítico de cobre en determinadas reacciones. Así, Pourreza y Behpour han utilizado el efecto catalítico de cobre sobre la reacción del ácido dinitrofenilhidrazona-1,2-naftoquinona-4-sulfónico (DPHNS) a pH 10 con peróxido de hidrógeno²⁸. El descenso de la absorbancia a 570 nm después de haber transcurrido 10 minutos desde la adición de cobre es el parámetro utilizado para la

²⁶ Ghazy, S.E.; El-Shazly, R.M.; El-Shahawi, M.S.; Al-Hazmi, G.A.A.; El-Asmy, A.A. Spectrophotometric determination of copper(II) in natural waters, vitamins and certified steel scrap samples using acetophenone-p-chlorophenylthiosemicarbazone. J. Iranian Chem. Soc., 3(2), 140, 2006.

²⁷ Fu, D.; Yuan, D. Spectrophotometric determination of trace copper in water samples with thiomichlersketone. Spectrochim. Acta Part A, 66, 434, 2007.

²⁸ Pourreza, N.; Behpour, M. Catalytic spectrophotometric determination of trace amounts of copper(II) based on the oxidation of 2,4-dinitrophenylhydrazone-1,2-naphtoquinone-4-sulfonic acid by hydrogen peroxide. Anal. Sci., 14, 997, 1998.

cuantificación del analito. Un factor importante en el desarrollo de la reacción era la temperatura a la que ésta tenía lugar, obteniendo resultados más satisfactorios cuando ésta se mantenía a 40°C. De este modo, el intervalo de linealidad para cobre a esa temperatura era 0,5-25 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, con un límite de detección de 0,2 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$. También, en un medio alcalino, Safavi y col. han empleado el efecto catalítico de cobre en la reacción de reducción de Ponceau S por sulfuro de hidrógeno²⁹. Con este método se obtuvo un intervalo de linealidad para cobre de 2-400 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ y un límite de detección de 0,4 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$. Otro ejemplo del efecto catalítico de cobre es el propuesto por Kumar y col., en el que se produce la oxidación catalítica de 3-hidroxiacetanilida por cobre(II) seguida por el acoplamiento con 3-metil-2-benzotiazolinona hidrazona en presencia de amoníaco y ácido clorhídrico para formar un complejo coloreado³⁰. Las medidas espectrofotométricas a 530 nm se utilizaban para determinar cobre, con un coeficiente de absortividad molar de $2,5\cdot 10^5 \text{ L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$. El intervalo de concentración de cobre para el que se cumplía la ley de Beer era 0,008-0,16 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$, obteniendo un límite de detección de 3 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$. Surendra Prasad estudió el efecto catalítico de cobre en la reacción de oxidación del ácido cítrico por hexacianoferrato(III) en medio básico³¹. El descenso de la absorbancia a 420 nm era el parámetro empleado para cuantificar cobre, obteniéndose un intervalo de concentraciones bastante amplio, (0,006-25,4 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$), y un límite de detección de 4 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$.

Métodos con Preconcentración

En muchas ocasiones, la baja concentración a la que se encuentra el analito en la muestra requiere de un paso previo de separación y/o preconcentración para poder determinarlo. En este sentido, se encuentran en la bibliografía diferentes métodos espectrofotométricos que utilizan la extracción en fase sólida para separar y/o preconcentrar cobre. Así, Fernández de Córdova y col. utilizaron una resina de

²⁹ Safavi, A.; Maleki, N.; Farjami, F. Selective kinetic spectrophotometric determination of copper at nanograms per milliliter level. *Talanta*, 54, 397, 2001.

³⁰ Kumar, M.S.H.; Nagaraja, P.; Yathirajan, H.S.. Copper(II)-catalysed oxidative coupling reaction of 3-hydroxyacetanilide with 3-methyl-2-benzothiazolinone hydrazone for the spectrophotometric determination of traces of copper(II). *Anal. Bioanal. Chem.*, 375, 315, 2003.

³¹ Prasad, S. Kinetic method for determination of nanogram amount of copper(II) by its catalytic effect on hexacyanoferrate(III)-citric acid indicator reaction. *Anal. Chim. Acta*, 540, 173, 2005.

CAPÍTULO 1

intercambio aniónico, estireno-divinilbenceno (Dowex 1-X8), para separar y preconcentrar el complejo de cobre con PAR³². Empleando un volumen de 1000 mL de muestra obtuvieron un intervalo de linealidad para cobre de 0,3-4,5 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ y un límite de detección de 0,067 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$. Un procedimiento aún más complejo y tedioso fue propuesto por Shimizu y col., en el que el complejo formado por cobre y el ácido 5,10,15,20-tetrafenil-21H,23H-porfinotetrasulfónico (TPPS) se extraía en un filtro de membrana que contenía cloruro de bencildimetiltetradecilamonio³³. La absorbancia del complejo Cu(II)-TPPS se medía en la fase sólida, obteniéndose un intervalo lineal para la concentración de cobre hasta 1 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ y un límite de detección de 0,15 ng. Otro ejemplo se encuentra en los trabajos realizados por Thakur y Deb, en los que forman el complejo de cobre con 1-(2-piridilazo)-2-naftol (PAN) como reactivo cromogénico, N,N'-difenilbenzamidina (DPBA) disuelto en cloroformo como agente extractante y Triton X-100 como tensioactivo³⁴. El complejo formado en cloroformo, Cu(II)-PAN-(TX-100)-DPBA, presentaba un máximo de absorbancia a 520 nm con un coeficiente de absortividad molar de $1,15\cdot 10^5 \text{ L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$. La ley de Beer se cumple hasta 0,6 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de Cu(II) y el límite de detección que obtuvieron fue 2 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ en la fase orgánica. En los trabajos realizados por Morales y col., se emplea un intercambiador aniónico (DEAE Sephadex A25) para retener el reactivo, 5-(4-sulfofenilazo)-8-aminoquinolina, sobre el que posteriormente forman y preconcentran el complejo de cobre³⁵. Para cuantificar el analito miden directamente en la fase sólida empleando la primera derivada a 605 nm. En estas condiciones, obtuvieron un intervalo de linealidad de 2-60 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ y un límite de detección de 0,6 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ para un volumen de 200 mL de muestra. Otros métodos utilizan la preconcentración del complejo del analito en una película delgada de cloruro de

³² Fernández de Córdova, M.L.; Molina-Díaz, A.; Pascual-Reguera, M.I.; Capitán-Vallvey, L.F. Determination of trace amounts of copper with 4-(2-pyridylazo)resorcinol by solid phase spectrophotometry. *Fresenius J. Anal. Chem.*, 349, 722, 1994.

³³ Shimizu, T.; Nukatsuka, I.; Ohzeki, K. Extraction of trace amounts of copper(II) on a membrane filter using 5,10,15,20-tetraphenyl-21H,23H-porphinetetrasulfonic acid for the determination by solid-phase spectrophotometry. *Anal. Sci.*, 15, 153, 1999.

³⁴ Thakur, M.; Kanti, M. The use of 1-(pyridil-2-azo)-naphtol-2 in the presence of TX-100 and N,N'-diphenylbenzamidine for the spectrophotometric determination of copper in real samples. *Talanta*, 49, 561, 1999.

³⁵ Morales, L.; Toral, M.I.; Álvarez, M.J. A new Cu(II)-5-(4-sulphophenylazo)-8-aminoquinoline complex used for copper determination in presence of gold and silver in water and mineral samples. *Talanta*, 74, 110, 2007.

cetiltrimetilamonio y ácido sulfosalicílico³⁶, la extracción en un filtro de membrana impregnado con metanol³⁷, la extracción repetida del complejo en cloroformo³⁸ o en n-butanol³⁹.

Métodos en Continuo. Análisis por Inyección en Flujo (FIA)

Todos los métodos expuestos anteriormente requieren la manipulación tanto de muestras como de reactivos para formar los complejos coloreados correspondientes. Además, en algunas ocasiones hay que esperar durante periodos de tiempo relativamente largos o incluso calentar las muestras antes de que se pueda realizar su medida. Estos hechos pueden provocar una disminución en el número de análisis que pueden efectuarse durante una jornada de trabajo así como la generación de relativamente una gran cantidad de residuos, que en algunas ocasiones pueden resultar tóxicos para el medioambiente. Por otro lado, aumenta el coste por análisis ya que se emplean volúmenes relativamente elevados de disoluciones. Una técnica que permite reducir algunas de las trabas señaladas es el análisis por inyección en flujo (FIA), ya que permite reducir notablemente el volumen necesario tanto de muestra como de reactivos así como el tiempo de análisis si las reacciones son rápidas. Además, otras características importantes son su simplicidad, versatilidad y mejora de la reproducibilidad. Por otra parte, una ventaja adicional muy a considerar es la posibilidad de tener un sistema de detección simple, barato y portátil que pueda usarse en controles de campo y de campo automatizado (controles *at-line* y *on-line*) en análisis medioambiental. El sistema FIA más sencillo podemos considerarlo formado por un canal por el que circula, impulsado por una bomba peristáltica a una velocidad constante, la disolución de reactivo y en un determinado instante se inyecta un pequeño

³⁶ Endo, M.; Suzuki, K.; Abe, S. Novel preconcentration technique for trace metal ions by aggregate film formation. Spectrophotometric determination of copper(II). Anal. Chim. Acta, 364, 13, 1998.

³⁷ Yamini, Y.; Tamaddon, A. Solid-phase extraction and spectrophotometric determination of trace amounts of copper in water samples. Talanta, 49, 119, 1999.

³⁸ Rekha, D.; Suvardhan, K.; Suresh Kumar, K.; Reddyprasad, P.; Jayaraj, B.; Chiranjeevi, P. J. Extractive spectrophotometric determination of copper(II) in water and alloy samples with 3-methoxy-4-hydroxybenzaldehyde-4-bromophenyl hydrazone (3,4-MHBBPH). Serb. Chem. Soc., 72(3), 299, 2007

³⁹ Janardhan Reddy, K.; Rajesh Kumar, J.; Lakshmi Narayana, S.; Ramachandraiah, C.; Thriveni, T.; Varada Reddy, A. N-ethyl-3-carbazolecarboxaldehyde-3-thiosemicarbazone: a new extractive spectrophotometric reagent for the determination of copper(II) in environmental and pharmaceutical samples. Environ. Monit. Assess., 124, 309, 2007.

CAPÍTULO 1

volumen de muestra. Como consecuencia del movimiento de la disolución del reactivo a lo largo del tubo, se producirá la mezcla entre ambas disoluciones dando lugar a la formación del complejo coloreado en su camino hacia el sistema de detección, registrándose una señal en forma de pico bien definido a lo largo del tiempo.

En lo que sigue se mencionarán ejemplos recientes encontrados en la bibliografía para la determinación espectrofotométrica de cobre en muestras medioambientales utilizando la técnica del análisis por inyección en flujo (FIA).

Métodos Directos

Se puede mencionar la determinación de cobre con un sistema FIA sencillo en aguas residuales mediante la formación del complejo coloreado con la sal Nitroso-R⁴⁰. Tras optimizar las variables tanto químicas como hidrodinámicas del sistema utilizando el modo univariante y multivariante, se obtuvieron un intervalo de linealidad y límite de detección para cobre de 1,0-7,0 mg·L⁻¹ y de 0,68 mg·L⁻¹, respectivamente. Una de las características más destacables de este método es su frecuencia de muestreo, ya que permite el análisis de 150 muestras a la hora. En el sistema FIA desarrollado por Cassella para determinar cobre en las aguas residuales de una refinería petrolífera se obtuvo una frecuencia de muestreo inferior, 63 muestras a la hora, pero se conseguía un límite de detección de 23 µg·L⁻¹. La formación del complejo coloreado se obtenía empleando DDTC como reactivo⁴¹. También para determinar cobre en aguas residuales, pero en esta ocasión de una industria de galvanizado, Leelasattarakul y col. han desarrollado un sistema de inyección en flujo al que los autores denominan µ-FIA⁴². Con este diseño minimizaban tanto el consumo de muestras (2 µL) como de reactivos (0,01 mL·min⁻¹), con el consiguiente descenso en la generación de residuos. El reactivo que utilizaban para formar el complejo de cobre era Zincon, obteniendo una frecuencia de muestreo de 30 muestras a la hora y un límite de detección de 100 µg·L⁻¹.

⁴⁰ Purachat, B.; Liawruangrath, S.; Sooksamiti, P.; Rattanaphani, S.; Buddhasukh, D. Univariate and simplex optimization for the flow-injection spectrophotometric determination of copper using Nitroso-R salt as a complexing agent. *Anal. Sci.*, 17, 443, 2001.

⁴¹ Cassella, R. Flow injection spectrophotometric determination of copper in petroleum refinery wastewaters. *Microchem. J.*, 72, 17, 2002.

⁴² Leelasattarakul, T.; Liawruangrath, S.; Rayanakorn, M.; Liawruangrath, B.; Oungpipat, W.; Youngvises, N. Greener analytical method for the determination of copper(II) in wastewater by micro flow system with optical sensor. *Talanta*, 72, 126, 2007.

Para el análisis de cobre en muestras de aguas de río o de mar, se necesitan métodos cuyos límites de detección sean inferiores. Un ejemplo de este tipo lo constituye la utilización del ácido acetilsalicil-hidroxiámico, el cual forma un complejo verde con cobre que puede determinarse a 700 nm⁴³. La frecuencia de muestreo fue de 80 muestras a la hora, y se alcanzó un límite de detección de 1 µg·L⁻¹.

También, se ha utilizado el efecto catalítico del cobre sobre determinadas reacciones para su determinación por FIA. Así, estudiando el efecto catalítico que produce el metal sobre la reacción de oxidación de la hidroquinona por peróxido de hidrógeno, Cao y col. relacionaron la absorbancia a 490 nm de la quinona producida en la reacción para cuantificar el analito en los vapores condensados y las aguas de suministro de centrales eléctricas⁴⁴. En las condiciones óptimas de reacción, el intervalo de linealidad y el límite de detección para cobre fueron 5-100 µg·L⁻¹ y 0,25 µg·L⁻¹, respectivamente. Otro método que presenta una elevada frecuencia de análisis, 120 muestras a la hora, con un excelente límite de detección, 0,05 µg·L⁻¹ de cobre, lo constituye la reacción de oxidación de la 1,5-difenilcarbazida a difenilcarbazona favorecida por la presencia de cobre como catalizador⁴⁵. Un límite de detección similar, 0,07 µg·L⁻¹ de cobre, se obtuvo para la determinación secuencial de hierro(III) y cobre(II) empleando el efecto catalítico de éstos en la reacción de oxidación de N,N-dimetil-p-fenilendiamina (DPD) con peróxido de hidrógeno⁴⁶. Para cuantificar ambos analitos introducían en el sistema FIA dos bolos de muestra, el primero para la determinación de la concentración de cobre más hierro y en el segundo, al que se le adicionaba previamente trietilentetramina (TETA) para enmascarar cobre, se cuantificaba la concentración de hierro. También se ha utilizado el efecto catalítico de cobre en la reacción de acoplamiento oxidativo de la N,N-dimetil-p-fenilendiamina

⁴³ Asan, A.; Isildak, I.; Andac, M.; Yilmaz, F. A simple and selective flow-injection spectrophotometric determination of copper(II) by using acetylsalicylhydroxamic acid. *Talanta*, 60, 861, 2003.

⁴⁴ Cao, S.; Zhong, J.; Hasebe, K.; Hu, W. On-line monitoring of trace amounts of copper(II) in steam condensate and boiler feed-water by flow injection analysis based on its catalytic effect on the oxidation of hydroquinone by hydrogen peroxide. *Anal. Chim. Acta*, 331, 257, 1996.

⁴⁵ Crespo, G.A.; Andrade, F.J.; Iñón, F.A.; Tudino, M.B. Kinetic method for the determination of trace amounts of copper(II) in water matrices by its catalytic effect on the oxidation of 1,5-diphenylcarbazine. *Anal. Chim. Acta*, 539, 317, 2005.

⁴⁶ Luvongsa, S.; Tsuboi, T.; Motomizu, S. Sequential determination of trace amounts of iron and copper in water samples by flow injection analysis with catalytic spectrophotometric detection. *Anal. Sci.*, 22, 169, 2006.

CAPÍTULO 1

(DPD) en presencia de peróxido de hidrógeno con la 1,3-fenilendiamina (mPD)⁴⁷. La ley de Beer se cumple hasta $8 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ de cobre, obteniéndose un límite de detección de $0,05 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$. Con el sistema desarrollado se medían 24 muestras a la hora.

Métodos con Preconcentración

Debido a la versatilidad que poseen estos sistemas, el proceso de preconcentración se realiza de diferentes modos y en distintas posiciones a lo largo del sistema. Así, en los trabajos realizados por Yoshimura y col. se utilizó un intercambiador aniónico (QAE Sephadex A-25) empaquetado en la propia cubeta⁴⁸. A continuación, el complejo formado por cobre con el reactivo cromogénico, disulfonato de 4,7-difenil-2,9-dimetil-1,10-fenantrolina (PMPS), quedaba retenido por la resina en el interior de la cubeta y se medía su absorbancia a 484 nm. Para evitar que el complejo quedara adsorbido sobre las paredes de los tubos de PTFE empleados, era necesario adicionar un tensioactivo no iónico, nonaoxietilendodecileter (BL-9EX). Una vez realizada la medida, el complejo se eliminaba de la resina utilizando una disolución de ácido nítrico. Con este sistema se alcanzó un límite de detección para cobre de $0,08 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$. Se ha descrito el uso de una minicolumna con cambiador catiónico situada en el canal del reactivo, sobre la que los cationes de la muestra quedan previamente retenidos. Éstos se eluyen cuando reaccionan con el reactivo para formar el complejo coloreado. Esta configuración se utilizó por Işildak y col. para determinar cobre en muestras de diferente naturaleza⁴⁹. Este método consiste en la formación del complejo coloreado por elución de los cationes de cobre retenidos en una resina de intercambio catiónico (A650 W), situada inmediatamente después de la salida de la válvula de inyección, con una disolución de 4-metilpiperidinaditiocarbamato (4-MPDC), midiéndose la absorbancia del complejo a 435 nm. El intervalo de linealidad y el límite de detección que

⁴⁷ Luvongsa, S.; Takayanagi, T.; Oshima, M.; Motomizu, S. Novel catalytic oxidative coupling reaction of N,N-dimethyl-p-phenylenediamine with 1,3-phenylenediamine and its applications to the determination of copper and iron at trace levels by flow injection technique. *Anal. Chim. Acta*, 576, 261, 2006.

⁴⁸ Yoshimura, K.; Matsuoka, S.; Inokura, Y.; Hase, U. Flow analysis for trace amounts of copper by ion-exchanger phase absorptiometry with 4,7-diphenyl-2,9-dimethyl-1,10-phenantroline disulphonate and its application to the study of karst groundwater storm runoff. *Anal. Chim. Acta*, 268, 225, 1992.

⁴⁹ Işildak, I.; Asan, A.; Andaç, M. Spectrophotometric determination of copper(II) at low $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ levels using cation-exchange microcolumn in flow-injection. *Talanta*, 48, 219, 1999.

obtuvieron con este sistema fue $5\text{--}100\ \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ y $<0,5\ \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, respectivamente. Con este sistema podían determinarse 60 muestras a la hora. Utilizando la misma configuración, pero empleando como reactivo cromogénico otro derivado del ditiocarbamato, el 4-bencilpiperidinaditiocarbamato (4-BPDC), estos mismos autores consiguieron mejorar tanto el límite de detección como el número de muestras que podían analizarse⁵⁰. De este modo, obtuvieron un límite de detección para cobre de $0,35\ \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ con una frecuencia de análisis de 80 muestras a la hora. Otra alternativa consiste en situar la minicolumna cambiadora en el bucle de la muestra, donde quedan retenidos los iones de cobre, que posteriormente son eluidos con una disolución adecuada y cuando entran en contacto con el reactivo cromogénico forman el compuesto coloreado. Un ejemplo de este sistema de preconcentración de cobre para su determinación en muestras acuosas se encuentra en los trabajos de Araújo y col.⁵¹. El método está basado en la retención de cobre en una columna de polietilenimina inmovilizada en gránulos de gel de sílice y su posterior elución con una disolución apropiada de ácido nítrico. Ésta se pone en contacto con la disolución de reactivo cromogénico (PAR), dando lugar a la formación del complejo coloreado que se mide a 530 nm. Con este método se obtuvo un límite de detección para cobre de $13\ \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ y una frecuencia de análisis de 12 muestras a la hora. Empleando un sistema similar, pero en el que el complejo se obtenía tras la reacción con el dietilditiocarbamato (DDTC), se obtuvo un límite de detección para cobre de $8,4\ \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ y una frecuencia de análisis de 17 muestras a la hora⁵².

Desde hace unos años, se está introduciendo una nueva alternativa al análisis espectrofotométrico por FIA, el análisis por inyección secuencial (SIA). Esta técnica utiliza configuraciones similares a las utilizadas en FIA, pero se diferencian de éstas en que el reactivo y la muestra se aspiran secuencialmente como zonas que se acumulan en un tubo. Al cabo de cierto tiempo, se invierte la dirección del flujo impulsando las zonas

⁵⁰ Asan, A.; Andaç, M.; Işildak, I. Flow-injection spectrophotometric determination of copper(II) ion at low $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ levels using 4-benzylpiperidinedithiocarbamate. *Anal. Sci.*, 17, 1125, 2001.

⁵¹ Araújo, A.N.; Costa, R.C.C.; Alonso, J. Colorimetric determination of copper in aqueous samples using a flow injection system with a pre-concentration poly(ethylenimine) column. *Talanta*, 50, 337, 1999.

⁵² Moraes S.V.M.; Brasil, J.L.; Milcharek, C.D.; Martins, L.C.; Laranjo, M.T.; Gallas, M.R.; Benvenutti, E.V.; Lima, E.C. Use of 1,3-diaminepropane-3-propyl grafted onto a silica gel as a sorbent for flow-injection spectrophotometric determination of copper(II) in digests of biological materials and natural waters. *Spectrochim. Acta, Part A*, 62, 398, 2005.

CAPÍTULO 1

de muestra y reactivo hacia el tubo de reacción. En su camino, ambas zonas se mezclan unas con otras dando lugar a la formación del compuesto coloreado que posteriormente se mide en el detector. Un ejemplo de la utilización del análisis por inyección secuencial lo encontramos en los trabajos realizados por van Staden y Botha para determinar cobre en aguas mediante su reacción con dietilditiocarbamato (DDTC) sin necesidad de realizar la extracción del complejo⁵³. Obtuvieron un límite de detección de $0,2 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ y una frecuencia de análisis de 7 muestras a la hora. Mejoras evidentes en cuanto a límite de detección, $4 \text{ }\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, y frecuencia de análisis, 48 muestras a la hora, se encuentran en los trabajos realizados por Rumori y Cerdà para la cuantificación de cobre en diferentes tipos de muestras⁵⁴. Como reactivo cromogénico emplearon el ácido oxálico de la bis(ciclohexilidenhidracida) (Cuprizona), midiendo la absorbancia del complejo formado a 590 nm. La tercera generación del FIA la constituye la técnica SIA-LOV. Ésta se ha propuesto con el objetivo de reducir el consumo de muestras y reactivos y, por tanto, la generación de residuos hasta niveles de micro- y submicrolitros. Consiste en colocar en la parte superior de una válvula multiposición un sistema de varios canales en el que en uno de ellos se encuentra el sistema de detección, generalmente un espectrofotómetro de fibra óptica. Todo el conjunto está controlado por ordenador en el que se programa la secuencia del análisis. Un ejemplo de esta nueva técnica se encuentra en los trabajos realizados por Leelasattarathkul y col. para el análisis de cobre en aguas residuales empleando Zincon⁵⁵. El intervalo de concentración y el límite de detección de cobre que obtuvieron fueron $0,1\text{-}2,0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ y $0,05 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$, respectivamente. La frecuencia de análisis fue bastante elevada, hasta 120 muestras a la hora.

3.1.2. Otros Métodos. En este apartado se citarán algunos ejemplos recientes de otras técnicas que también se han desarrollado para el análisis de cobre en aguas naturales.

⁵³ van Staden, J.F.; Botha, A. Spectrophotometric determination of Cu(II) with sequential injection analysis. *Talanta*, 49, 1099, 1999.

⁵⁴ Rumori, P.; Cerdà, V. Reversed flow injection and sandwich sequential injection methods for the spectrophotometric determination of copper(II) with cuprizone. *Anal. Chim. Acta*, 486, 227, 2003.

⁵⁵ Leelasattarathkul, T.; Liawruangrath, S.; Rayanakorn, M.; Oungpipat, W.; Liawruangrath, B. The development of sequential injection analysis coupled with lab-on-valve for copper determination. *Talanta*, 70, 656, 2006.

Comenzaremos por las *técnicas electroanalíticas*, las cuales se pueden situar entre los analizadores más importantes para el análisis de metales traza, siendo las voltamétricas de redisolución tanto anódica (ASV, DPASV) como catódica (CSV), las que ofrecen mayores ventajas. Así, Monterroso y col. utilizaron la voltametría de redisolución anódica de onda cuadrada y poli(4-estirenosulfonato sódico) como recubrimiento del electrodo de carbono vítreo para determinar cobre y otros elementos en aguas residuales⁵⁶. Cuando emplearon una mezcla de polielectrolitos como recubrimiento del electrodo (poli-L-lisina y poli(4-estirenosulfonato sódico)), obtuvieron mejoras tanto en la reproducibilidad como en la repetibilidad de las medidas⁵⁷. También mediante ASV, Monticelli y col. han optimizado y validado un método automatizado para determinar cobre, cadmio y plomo en aguas de lagos⁵⁸. Ensafi y col. han usado la CSV para determinar simultáneamente molibdeno y cobre basándose en los complejos que formaban ambos con rojo de Pirogalol⁵⁹. Utilizando el electrodo de gotas de mercurio (HMDE) obtuvieron un límite de detección para cobre de $0,3 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$. Un límite de detección aún más bajo, $0,08 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, mediante CSV y empleando el electrodo de gotas de mercurio (HMDE), se indica en los trabajos realizados por Khaloo y col. para cuantificar bismuto y cobre tras la formación de sus complejos con Cromoazurol-S⁶⁰.

También, se han empleado electrodos selectivos de iones, como en los estudios realizados por Szigeti y col. para evaluar cobre utilizando un electrodo de membrana

⁵⁶ Monterroso, S.C.C.; Carapuça, H.M.; Duarte, A.C. Ion-exchange and permselectivity of poly(sodium 4-styrenesulfonate) coatings on glassy carbon: application in the modification of mercury film electrodes for the direct voltammetric analysis of trace metals in estuarine waters. *Talanta*, 65, 644, 2005.

⁵⁷ Monterroso, S.C.C.; Carapuça, H.M.; Duarte, A.C. Mixed polyelectrolyte coatings on glassy carbon electrodes: Ion-exchange, permselectivity properties and analytical application of poly-L-lysine-poly(sodium 4-styrenesulfonate)-coated mercury film electrodes for the detection of trace metals. *Talanta*, 68, 1655, 2006.

⁵⁸ Monticelli, D.; Ciceri, E.; Dossi, C. Optimization and validation of an automated voltammetric stripping technique for ultratrace metal analysis. *Anal. Chim. Acta*, 594, 192, 2007.

⁵⁹ Ensafi, A.A.; Khayamian, T.; Khaloo, S.S. Application of adsorptive cathodic differential pulse stripping method for simultaneous determination of copper and molybdenum using pyrogallol red. *Anal. Chim. Acta*, 505, 201, 2004.

⁶⁰ Khaloo, S.S.; Ensafi, A.A.; Khayamian, T. Determination of bismuth and copper using adsorptive stripping voltammetry couple with continuous wavelet transform. *Talanta*, 71, 324, 2007.

CAPÍTULO 1

polimérica⁶¹. Obtuvieron límites de detección de $0,13 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1} \text{ Cu}^{2+}$. Recientemente, Hassan y col. han desarrollado dos nuevos sensores utilizando derivados cíclicos de tetrapéptidos para determinar cobre con límites de detección aún más bajos⁶², $0,05 - 0,13 \text{ ng}\cdot\text{L}^{-1}$.

La *espectroscopia de absorción atómica de llama*, es una de las técnicas que mayor implantación tiene en la mayoría de los laboratorios analíticos debido a su relativa simplicidad, buena exactitud, precisión y coste para la cuantificación de especies inorgánicas en una gran cantidad de muestras. No obstante, debido a los bajos niveles de concentración en los que suele encontrarse este elemento en aguas naturales y agua de mar, la metodología analítica está precedida en la mayoría de las ocasiones por la introducción de un paso previo de preconcentración. En este sentido, Doner y Ege emplearon la coprecipitación con hidróxido de aluminio y posterior disolución en medio ácido para determinar cobre, cadmio y plomo en muestras de agua de mar y agua mineral⁶³. Con este sistema conseguían un factor de preconcentración de 125 y un límite de detección para cobre de $3 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$. Mejores resultados en cuanto al límite de detección ($0,5 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) y factor de preconcentración (200), se obtienen cuando se emplea 4-metilpiperidinditiocarbamato potásico como coprecipitante⁶⁴. En los últimos años, ha crecido notablemente el número de métodos que adaptan la preconcentración *on-line* utilizando un sistema en flujo acoplado a la espectroscopia de absorción atómica de llama (FI-FAAS) para la determinación de cobre. Todos ellos se caracterizan por la utilización de columnas empaquetadas rellenas de una fase estacionaria adecuada en la que el analito forma un complejo con un agente quelatante apropiado y queda adsorbido. Posteriormente, el metal se extrae con un eluyente adecuado y se determina

⁶¹ Szigeti, Z.; Bitter, I.; Tóth, K.; Latkoczy, C.; Fliegel, D.J.; Günther, D.; Prersch, E. A novel polymeric membrane electrode for the potentiometric analysis of Cu^{2+} in drinking water. *Anal. Chim. Acta*, 532, 129, 2005.

⁶² Hassan, S.S.M.; Elnemma, E.M.; Mohamed, A.H.K. Novel potentiometric copper(II) selective membrane sensors based on cyclic tetrapeptide derivatives as neutral ionophores. *Talanta*, 66, 1034, 2005.

⁶³ Doner, G.; Ege, A. Determination of copper, cadmium and lead in seawater and mineral water by flame atomic absorption spectrometry after coprecipitation with aluminum hydroxide. *Anal. Chim. Acta*, 547, 14, 2005.

⁶⁴ Efendioglu, A.; Yagan, M.; Bati, B. Bi(III)-4-methylpiperidinedithiocarbamate coprecipitation procedure for separation-pre-concentration of trace metal ions in water samples by flame atomic absorption spectrometric determination. *J. Hazard. Mater.*, 149, 160, 2007.

por FAAS. Así, Yebra y col. empleando una minicolumna empaquetada con Amberlita XAD-4 impregnada con PAN preconcentran cobre sin la interferencia de la matriz salina obteniendo un límite de detección de $0,06 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ con un factor de enriquecimiento de 30⁶⁵. Del mismo modo, Anthemidis y col. han desarrollado una minicolumna empaquetada con policlorotrifluoroetileno (PCTFE) para preconcentrar el complejo de cobre con dietilditiofosfato (DDPA)⁶⁶. El límite de detección obtenido fue de $0,07 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ con un factor de enriquecimiento de 250.

Ghiasvand y col. han usado discos de octadecilsílice modificados con bis(2-hidroxifenilamino) glioxima para preconcentrar cobre⁶⁷. El límite de detección para este método es de $0,004 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$.

Una alternativa a FAAS es la *espectroscopia de absorción atómica en horno de grafito*. Esta técnica presenta ventajas respecto a la llama en cuanto a sensibilidad, volumen de muestra necesario y selectividad, entre otras. En principio, se puede aplicar directamente para la determinación de elementos traza en muchas muestras de aguas naturales acidificadas debido a que su sensibilidad es adecuada. No obstante, en el caso del agua de mar o en muestras fraccionadas para realizar la especiación del analito es a veces necesario realizar un paso previo de preconcentración antes de efectuar el análisis así como la adición de modificadores de matriz adecuados. En este sentido, algunos autores han alcanzado buenos límites de detección: Tokman y col.⁶⁸, L.D. = $3,6 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$; Acar⁶⁹, L.D. = $0,57 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$; Queiroz y col.⁷⁰, L.D. = $5 \text{ ng}\cdot\text{L}^{-1}$.

⁶⁵ Yebra, M.C.; Carro, N.; Enríquez, M.F.; Moreno-Cid, A.; García, A. Field sample preconcentration of copper in sea water using chelating minicolumns subsequently incorporated on a flow-injection-flame atomic absorption spectrometry system. *The Analyst*, 126, 933, 2001.

⁶⁶ Anthemidis, A.N.; Ioannou, K.I.G. Evaluation of polychlorotrifluoroethylene as sorbent material for on-line solid phase extraction systems: Determination of copper and lead by flame atomic absorption spectrometry in water samples. *Anal. Chim. Acta*, 575, 126, 2006.

⁶⁷ Ghiasvand, A.R.; Ghaderi, R.; Kakanejadifard, A. Selective preconcentration of ultra trace copper(II) using octadecyl silica membrane disks modified by a recently synthesized glycosime derivative. *Talanta*, 62, 287, 2004.

⁶⁸ Tokman, N.; Akman, S.; Ozeroglu, C. Determination of lead, copper and manganese by graphite furnace atomic absorption spectrometry after separation/concentration using a water-soluble polymer. *Talanta*, 63, 699, 2004.

⁶⁹ Acar, O. Determination of cadmium, copper and lead in soils, sediments and sea water samples by ETAAS using a Sc + Pd + NH_4NO_3 chemical modifier. *Talanta*, 65, 672, 2005.

CAPÍTULO 1

También, se utiliza la *espectroscopia de emisión en plasma*, siendo la de plasma acoplado inductivamente (ICP) la que mayor implantación tiene. En esta técnica, el plasma permite alcanzar temperaturas de hasta 10.000 K, lo que asegura la completa atomización de la muestra, además de realizarse en un medio químicamente inerte. Otra ventaja respecto de las anteriores técnicas analíticas es la posibilidad de realizar análisis multielementales en tiempos relativamente cortos. No obstante, presenta inconvenientes importantes, como por ejemplo sus elevados costes de mantenimiento y adquisición, consumo de agua y electricidad, etc. Esto hace que esta técnica no sea muy accesible para muchos laboratorios de investigación. Para el análisis de elementos traza en aguas naturales no contaminadas presenta los mismos problemas que las técnicas precedentes, no es lo suficientemente sensible como para permitir los análisis, por lo que es habitual acudir a técnicas de preconcentración/separación previas a la medida. Así, Ferreira y col. han conseguido un límite de detección para cobre en agua de mar de $94 \text{ ng}\cdot\text{L}^{-1}$ tras su preconcentración utilizando la extracción en fase sólida⁷¹. En los trabajos realizados por Sabarudin y col. se indica un límite de detección de $70 \text{ ng}\cdot\text{L}^{-1}$ empleando la preconcentración *on-line* de la muestra sobre una resina que contiene ácido 3,4-dihidroxibenzóico⁷². Utilizando otro derivado del ácido benzóico, el ácido 2-amino-5-hidroxibenzóico, retenido sobre una resina para la preconcentración *on-line* y el análisis por inyección secuencial acoplado a ICP-AES, el límite de detección alcanzado fue de $6 \text{ ng}\cdot\text{L}^{-1}$ de cobre⁷³. En los últimos años, el acoplamiento de esta técnica con la espectrometría de masas está mostrándose como una valiosa nueva alternativa. En esta hibridación, la muestra se introduce en el ICP, en el que se produce su atomización e

⁷⁰ Queiroz, Z.F.; Rocha, F.R.P.; Knapp, G.; Krug, F.J. Flow system with in-line separation/preconcentration coupled to graphite furnace atomic absorption spectrometry with W-Rh permanent modifier for copper determination in seawater. *Anal. Chim. Acta*, 463, 275, 2002.

⁷¹ Ferreira, S.L.C.; Queiroz, A.S.; Fernandes, M.S.; dos Santos, H.C. Application of factorial design and Doehlert matrix in optimization of experimental variables associated with the preconcentration and determination of vanadium and copper in seawater by inductively coupled plasma optical emission spectrometry. *Spectrochim. Acta, Part B*, 57, 1939, 2002.

⁷² Sabarudin, A.; Noguchi, O.; Oshima, M.; Higuchi, K.; Motomizu, S. Application of chitosan functionalized with 3,4-dihydroxy benzoic acid moiety for on-line preconcentration and determination of trace elements in water samples. *Microchim. Acta*, 159, 341, 2007.

⁷³ Sabarudin, A.; Lenghor, N.; Oshima, M.; Hakim, L.; Takayanagi, T.; Gao, Y.H.; Motomizu, S. Sequential-injection on-line preconcentration using chitosan resin functionalized with 2-amino-5-hydroxy benzoic acid for the determination of trace elements in environmental water samples by inductively coupled plasma-atomic absorption spectrometry. *Talanta*, 72, 1609, 2007.

ionización, y posteriormente los iones formados pasan al espectrómetro de masas para realizar la cuantificación de los analitos. A este tenor, Ndung'u y col. han comparado el uso de la extracción líquido-líquido y posterior medida por GFAAS con la preconcentración *on-line* en una columna y posterior determinación por ICP-MS⁷⁴. Los autores concluyeron que era necesario someter las muestras a digestión UV antes de su preconcentración y posterior medida por ICP-MS para que las concentraciones de los metales estudiados fueran coincidentes con las obtenidas por GFAAS.

Por último, se mencionarán otras técnicas empleadas para determinar cobre en muestras naturales, aunque de uso poco frecuente. Así, la fluorescencia de rayos X por energía dispersa se ha usado para la determinación simultánea de cobre y otros seis elementos en muestras medioambientales tras su preconcentración con piperazin-1,4-bis(ditiocarbamato)⁷⁵, o la determinación de cobre, mercurio y plomo en agua potable tras su preconcentración con una mezcla de NaDDTC y APDC empleando la fluorescencia de rayos X de reflexión total⁷⁶.

3.2. Métodos de Análisis de Cinc en Aguas Naturales

Del mismo modo que ocurre para el análisis de cobre en aguas naturales, la determinación de la concentración de cinc en éstas requiere el uso de técnicas analíticas lo suficientemente sensibles como para permitir alcanzar los niveles de concentración en los que aparece. Para ello, en la mayoría de las ocasiones ha sido necesaria la introducción de un paso previo de separación/preconcentración. A continuación se comentarán brevemente algunos de los trabajos recientes más interesantes realizados para el análisis de cinc en muestras acuosas.

⁷⁴ Ndung'u, K.; Franks, R.P.; Bruland, K.W.; Flegal, A.R. Organic complexation and total dissolved trace metal analysis in estuarine waters: comparison of solvent-extraction graphite furnace atomic absorption spectrometric and chelating resin flow injection inductively coupled plasma-mass spectrometric analysis. *Anal. Chim. Acta*, 481, 127, 2003.

⁷⁵ Lau, O.; Ho, S. Simultaneous determination of traces of iron, cobalt, nickel, copper, mercury and lead in water by energy-dispersive x-ray fluorescence spectrometry after preconcentration as their piperazino-1,4-bis(dithiocarbamate) complexes. *Anal. Chim. Acta*, 280 (2), 269, 1993.

⁷⁶ Holyńska, B.; Ostachowicz, B.; Węgrzynek, D. Simple method of determination of copper, mercury and lead in potable water with preliminary pre-concentration by total reflection X-ray fluorescence spectrometry. *Spectrochim. Acta, Part B*, 51, 769, 1996.

CAPÍTULO 1

3.2.1. Complejos orgánicos coloreados de cinc. Para la determinación espectrofotométrica de cinc se han propuesto diversos reactivos orgánicos, siendo los más habituales la ditizona, el Zincon y el 1-(2-piridilazo)-2-naftol (PAN)^{77,78}.

Métodos Discontinuos

Métodos Directos

Reddy y col. para determinar la concentración de cinc en muestras biológicas y medioambientales han empleado como reactivo cromogénico la ditiosemicarbazona del bencilo (BDTSC)⁷⁹. Una vez formado el complejo, lo extraían previamente en cloroformo, obteniendo un valor para la absorptividad molar de $\epsilon = 4,2 \cdot 10^3 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$. Las interferencias de otros iones se eliminaban utilizando disoluciones enmascarantes de tiosulfato (para cobre, níquel y cobalto) y citrato (para plomo y manganeso). La determinación de cinc en aguas naturales y suplementos nutricionales se ha realizado por Kilian y Pyrzyńska⁸⁰. Estos autores, utilizan el reactivo 5,10,15,20-tetraquis(4-carboxifenil)porfirina, así como el efecto catalítico de plomo (II), para formar el complejo con cinc y determinar su concentración. El coeficiente de absorptividad molar y el límite de detección que obtuvieron fueron $3,5 \cdot 10^5 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ y $0,9 \text{ } \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$, respectivamente. Afkhami y col. comparaban el método de regresión por mínimos cuadrados parciales (PLS) y el método de la adición patrón en el punto H (HPSAM) para la determinación simultánea de cinc, cobalto y níquel mediante la formación de sus respectivos complejos con 1-(2-piridilazo)2-naftol (PAN) en un medio tensioactivo proporcionado por Triton X-100⁸¹. Los autores concluyeron que con ambos métodos se obtenían resultados similares. Posteriormente, Afkhami y Bahram han empleado la

⁷⁷ Marczenko, Z. *Spectrophotometric determination of elements. Capítulo 60*. John Wiley & Sons Inc., New York, 1976.

⁷⁸ Lobinski, R.; Marczenko, Z. *Spectrochemical trace analysis for metals and metalloids*. Elsevier, Amsterdam, 3ª Ed., 2002.

⁷⁹ Reddy, B.K.; Kumar, J.R.; Sarma, L.S.; Reddy, A.V. Sensitive extractive spectrophotometric determination of zinc(II) in biological and environmental samples using benzildithiosemicarbazone. *Anal. Lett.*, 35 (8), 1415, 2002.

⁸⁰ Kilian, K.; Pyrzyńska, K. Spectrophotometric study of Cd(II), Pb(II), Hg(II) and Zn(II) complexes with 5,10,15,20-tetrakis(4-carboxylphenyl)porphyrin. *Talanta*, 60, 669, 2003.

⁸¹ Afkhami, A.; Bahram, M.; Zarei, A.R. Comparison of partial least squares regression and H-Point standard addition method for simultaneous determination of zinc, cobalt and nickel by 1-(2-pyridylazo)2-naphthol in micellar media. *Microchim. Acta*, 148, 317, 2004.

extracción en el punto micelar (“cloud-point extraction”) y PLS1 para la determinación simultánea de cinc, cobalto y níquel en muestras acuosas y de orina⁸². En esta ocasión, los complejos formados con PAN se recogían en el tensioactivo Triton X-114. Otro ejemplo del empleo de PAN como reactivo cromogénico y de Triton X-100 como tensioactivo se encuentra en los trabajos realizados por Arvand y col. para determinar cinc y cobre en muestras de aleaciones y sintéticas mediante HPSAM⁸³. También se ha realizado la determinación simultánea de mezclas binarias (Zn y Cd) mediante la formación de los complejos con 2-(5-bromo-2-piridilazo)-5-dietilaminofenol en un medio tensioactivo, proporcionado en esta ocasión por el cloruro de cetilpiridinio (CPC)⁸⁴. Para resolver las mezclas empleaban el espectro de derivadas, en concreto la 2ª derivada, obteniendo un límite de detección para cinc de $19,6 \text{ ng}\cdot\text{L}^{-1}$, algo más de cien veces superior al que obtenían midiendo en el modo normal ($1,52 \text{ }\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$). El coeficiente de absortividad molar también fue elevado, $1,19\cdot 10^5 \text{ L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$. Sivaramaiah y Raveendra han empleado el reactivo isonicotinóil hidrazona 2,4-dihidroxibenzaldehído para determinar la concentración de cinc en aguas potables y muestras farmacéuticas⁸⁵. Estos autores obtuvieron un valor para la absortividad molar, $\varepsilon = 3,55\cdot 10^4 \text{ L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$. Además, alcanzan mayor sensibilidad del método cuando se emplea la espectrofotometría de derivadas. Un límite de detección similar, $11 \text{ }\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ de cinc, se indica en los trabajos realizados por Ni y col. para la determinación simultánea de hierro(II), cobre, cinc y manganeso en mezclas mediante la formación de los complejos con 4-(2-piridilazo)-resorcinol (PAR)⁸⁶. Los autores utilizan diversos métodos de

⁸² Afkhami, A.; Bahram, M. Cloud point extraction simultaneous spectrophotometric determination of Zn(II), Co(II) and Ni(II) in water and urine samples by 1-(2-pyridylazo)2-naphtol using partial least squares regression. *Microchim. Acta*, 155, 403, 2006.

⁸³ Arvand, M.; Abolghasemi, S.; Zanjanchi, M.A. Simultaneous determination of zinc and copper(II) with 1-(2-pyridylazo)2-naphtol in micellar media by spectrophotometric H-Point standard addition method. *J. Anal. Chem.*, 62 (4), 342, 2007.

⁸⁴ Agnihotri, N.K.; Ratnani, S.; Singh, V.K.; Singh, H.B. Simultaneous derivative spectrophotometric determination of zinc and cadmium with 2-(5-bromo-2-pyridylazo)-5-diethylaminophenol in the presence of cetylpyridinium chloride. *Anal. Sci.*, 20, 955, 2004.

⁸⁵ Sivaramaiah, S.; Raveendra, R.P. Direct and derivative spectrophotometric determination of zinc with 2,4-dihydroxybenzaldehyde isonicotinoyl hydrazone in potable water and pharmaceutical samples. *J. Anal. Chem.*, 60, 828, 2005.

⁸⁶ Ni, Y.; Wang, Y.; Kokot, S. Application of multivariate calibration methods for the simultaneous multiwavelength spectrophotometric determination of Fe(II), Cu(II), Zn(II) and Mn(II) in mixtures. *Anal. Lett.*, 40, 1209, 2007.

CAPÍTULO 1

calibración multivariante para resolver las mezclas, concluyendo que PLS era el que proporcionaba los mejores resultados.

Métodos con Preconcentración

La necesidad de introducir un paso previo de separación y/o preconcentración antes de efectuar la medida surge como consecuencia de las bajas concentraciones en las que suele encontrarse el cinc en diferentes muestras ambientales. Así, para cuantificar la concentración de cinc en aguas naturales y sangre humana, Akl desarrolló un método basado en la extracción y preconcentración en metilisobutil cetona (MIBK) del complejo formado con el reactivo fenantroquina monofeniltiosemicarbazona (PPT)⁸⁷. El máximo factor de preconcentración que alcanzó fue de 40, con un valor de la absorptividad molar, midiendo la fase orgánica, elevado: $\varepsilon = 2,1 \cdot 10^5 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$. Cuando el complejo formado por PPT con cinc se preconcentró mediante flotación empleado ácido oléico como tensioactivo, se obtuvo un factor de preconcentración de 100⁸⁸. El método se aplicó con resultados satisfactorios a diversos tipos de muestras tales como fluidos biológicos, fármacos y aguas naturales. Los valores para el coeficiente de absorptividad molar y límite de detección fueron $1,83 \cdot 10^5 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ y $10 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$, respectivamente.

En otras ocasiones se ha empleado la espectrofotometría de fase sólida. En esta metodología, se produce la preconcentración del analito sobre un soporte sólido mediante la reacción previa o simultánea para producir un compuesto cromogénico, que posteriormente se determina espectrofotométricamente. En este sentido, Molina y col. evaluaron la concentración de cinc en muestras medioambientales mediante la formación del complejo con PAR en presencia de yoduro potásico y su posterior

⁸⁷ Akl, M.A. Spectrophotometric and AAS determinations of trace zinc(II) in natural waters and human blood after preconcentration with phenanthraquinone monophenylthiosemicarbazone. Anal. Sci., 17, 561, 2001.

⁸⁸ Akl, M.A. The use of phenanthraquinone monophenyl thiosemicarbazone for preconcentration, ion flotation and spectrometric determination of zinc(II) in human biofluids and pharmaceutical samples. Bull. Korean Chem. Soc., 27 (5), 725, 2006.

adsorción sobre el intercambiador aniónico Sephadex QAE A-25⁸⁹. Empleando un volumen de 100 mL de muestra obtuvieron un límite de detección de $2,5 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, mientras que éste se redujo hasta $0,3 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ cuando utilizaban 500 mL de muestra. Estos mismos autores empleando este método junto con la espectrofotometría de derivadas y el diseño de experimentos, consiguen determinar simultáneamente cadmio y cinc en aguas naturales⁹⁰. En las condiciones optimizadas obtuvieron un límite de detección para cinc de $0,19 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$.

Métodos en Continuo. Análisis por Inyección en Flujo (FIA)

Métodos Directos

Maniasso y col. han desarrollado un sistema FIA complejo para determinar níquel, cobalto y cinc en muestras sintéticas⁹¹. En primer lugar, se forman los correspondientes clorocomplejos metálicos que quedan adsorbidos en una mini-columna rellena con una resina aniónica Dowex AG1-X8 y, posteriormente, se eluyen de manera secuencial con ácido nítrico, reaccionando con Zincon antes de que se mida la absorbancia. Alcanzaron una frecuencia de muestreo de 45 muestras/hora. También utilizando Zincon como reactivo cromogénico y empleando las diferencias en las reacciones de intercambio de ligandos con ácidos poliaminocarboxílicos, Shpigun y col. desarrollaron un método para la determinación simultánea de cobre y cinc⁹². Obtuvieron una frecuencia de muestreo de 90 muestras/hora y un límite de detección para cinc de $60 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$. Este límite de detección se redujo a la mitad, $30 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ de cinc, cuando utilizaron PAR como reactivo cromogénico⁹³. Una frecuencia de muestreo superior, 120 muestras/hora y con un límite de detección de $15 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ de cinc, se describe en los

⁸⁹ Molina, M.F.; Nechar, M.; Bosque-Sendra, J.M. Determination of zinc in environmental samples by solid phase spectrophotometry: optimization and validation study. *Anal. Sci.*, 14, 791, 1998.

⁹⁰ Bosque-Sendra, J.M.; Nechar, M.; Molina, M.F. Experimental designs applied to solid-phase derivative spectrophotometry. *Mikrochim. Acta*, 134, 43, 2000.

⁹¹ Maniasso, N.; Zagatto, E.A.G.; Santelli, R.E. A new approach for compensating concentration gradients in flow analysis. *Anal. Chim. Acta*, 331, 17, 1996.

⁹² Shpigun, L.K.; Shushenachev, Y.V.; Kamilova, P.M. Kinetic separation in flow injection spectrophotometry: Simultaneous determination of copper and zinc in a single run. *Anal. Chim. Acta*, 573-574, 360, 2006.

⁹³ Shpigun, L.K.; Shushenachev, Y.V.; Kamilova, P.M. Simultaneous spectrophotometric determination of copper(II) and zinc(II) based on their kinetic separation in flow-injection systems. *J. Anal. Chem.*, 62 (7), 623, 2007.

CAPÍTULO 1

trabajos efectuados por Aggarwal y Patel para el análisis de cobalto y cinc en muestras de diferente composición (bebidas, biológicas, ambientales y fármacos)⁹⁴. También, en muestras de distinta composición, Yuanqian y col. empleando el método de regresión por mínimos cuadrados parciales (PLS) han determinado simultáneamente cinc, cadmio y plomo⁹⁵. La frecuencia de muestreo en las condiciones óptimas fue de 30 muestras/hora. Ayora-Cañada y col. han determinado cinc en muestras de diferente composición (cabello, productos farmacéuticos, cosméticos y aguas), utilizando un cambiador catiónico (Dowex 50X4) situado en la célula de flujo sobre el que estaba inmovilizado el reactivo cromogénico (PAN), formándose el complejo correspondiente con el analito cuando la muestra percolaba a través del mismo⁹⁶. En las condiciones óptimas, obtuvieron una frecuencia de muestreo de 38 muestras/hora con un límite de detección para cinc de $0,05 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$. Por otra parte, van Staden y Taljaard han propuesto un sistema de inyección secuencial (SIA) con ditizona como reactivo cromogénico para la determinación de siete cationes (Zn y otros) en diferentes tipos de muestras, entre ellas las medioambientales⁹⁷. En las condiciones optimizadas se pueden analizar 27 muestras/hora. Una frecuencia de muestreo superior, 40 muestras/hora, se obtiene en el sistema SIA desarrollado por Thanasarakhan y col. para determinar cinc en productos farmacéuticos⁹⁸. Utilizando PAN como reactivo cromogénico y Triton X-100 como tensioactivo lograban un límite de detección para cinc de $20 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$.

3.2.2. Otros Métodos. Del mismo modo que en el caso del cobre, la voltametría de redisolución, tanto catódica como anódica, ha sido de las técnicas más empleadas. A este tenor, Lau y Cheng utilizando ASV han determinado la concentración de cinc en

⁹⁴ Aggarwal, S.G.; Patel, K.S. Flow injection analysis of Zn and Co in beverages, biological, environmental and pharmaceutical samples. *Fresenius J. Anal. Chem.*, 362, 571, 1998.

⁹⁵ Yuanqian, L.; Jingmei, H.; Jingguo, Y.; Bo, Z.; Yuanqing, H. Multi-component analysis by flow injection-diode array detection-spectrophotometry using partial least squares calibration model for simultaneous determination of zinc, cadmium and lead. *Anal. Chim. Acta*, 461, 181, 2002.

⁹⁶ Ayora-Cañada, M.J.; Pascual-Reguera, M.I.; Molina, A. Continuous flow-through solid phase spectrophotometric determination of trace amounts of zinc. *Anal. Chim. Acta*, 375, 71, 1998.

⁹⁷ van Staden, J.F.; Taljaard, R.E. Determination of lead(II), copper(II), zinc(II), cobalt(II), cadmium(II), iron(III), mercury(II) using sequential injection extractions. *Talanta*, 64, 1203, 2004.

⁹⁸ Thanasarakhan, W.; Liawruangrath, S.; Wangkarn, S.; Liawruangrath, B. Sequential injection spectrophotometric determination of zinc(II) in pharmaceuticals based on zinc(II)-PAN in non-ionic surfactant medium. *Talanta*, 71, 1849, 2007.

muestras acuosas tras la adición de sulfuro para eliminar la interferencia de cobre⁹⁹. En estas condiciones obtuvieron un límite de detección para cinc de $10 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$. Este valor se redujo hasta $0,8 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ cuando se recubría previamente el electrodo de trabajo con una película de galio para eliminar las interferencias de cobre¹⁰⁰. Suteerapataranon y col. han desarrollado el acoplamiento de los sistemas FIA y SIA con el análisis por DPASV¹⁰¹. Con el sistema acoplado FIA-DPASV alcanzaron un límite de detección para cinc de $17 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, el cual lo han disminuído ligeramente, empleando la misma técnica acoplada (FIA-DPASV), van Staden y Matoetoe¹⁰². Los autores obtuvieron un límite de detección para cinc de $14,7 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$. Locatelli y Torsi han empleado el método de la adición patrón para evaluar cinc en presencia de manganeso en muestras acuosas¹⁰³. Emplearon como electrolito soporte una disolución reguladora de pH 9 y alcanzaron un límite de detección para cinc de $0,007 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$.

También, se han empleado las técnicas potenciométricas para cuantificar la concentración de cinc en muestras medioambientales como consecuencia del desarrollo de nuevos electrodos selectivos. En este sentido, Muñoz y col. aplicaron un sistema de flujo continuo para la determinación potenciométrica de cinc, cadmio, plomo, cobre, níquel, cobalto y cromo en agua de río¹⁰⁴. Para eliminar la interferencia de cobre en la determinación de cinc emplearon Ga(III), obteniendo un límite de detección de $0,25 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ para cinc.

Debido a los bajos niveles de concentración en los que se encuentra este metal en muestras acuosas naturales, su determinación utilizando FAAS normalmente está precedida por un paso previo de separación/preconcentración. Así, Giokas y col.

⁹⁹ Lau, O.; Cheng, O. Determination of zinc in environmental samples by anodic stripping voltammetry. *Anal. Chim. Acta*, 376, 197, 1998.

¹⁰⁰ Tyszczyk, K.; Korolczuk, M.; Grabarczyk, M. Application of gallium film electrode for elimination of copper interference in anodic stripping voltammetry of zinc. *Talanta*, 71, 2098, 2007.

¹⁰¹ Suteerapataranon, S.; Jakmunee, J.; Vaneesorn, Y.; Grudpan, K. Exploiting flow injection and sequential injection anodic stripping voltammetric systems for simultaneous determination of some metals. *Talanta*, 58, 1235, 2002.

¹⁰² van Staden, J.F.; Matoetoe, M.C. Simultaneous determination of copper, lead, cadmium and zinc using differential pulse anodic stripping voltammetry in a flow system. *Anal. Chim. Acta*, 411, 201, 2000.

¹⁰³ Locatelli, C.; Torsi, G. Voltammetric trace metal determinations by cathodic and anodic stripping voltammetry in environmental matrices in the presence of mutual interference. *J. Electroanal. Chem.*, 509, 80, 2001.

¹⁰⁴ Muñoz, E.; Palmero, S.; García, M.A. A continuous flow system design for simultaneous determination of heavy metals in river water samples. *Talanta*, 57, 985, 2002.

CAPÍTULO 1

utilizaron una membrana polimérica modificada con PAN para preconcentrar cinc antes de su medida¹⁰⁵. Lograron un límite de detección para el analito de $0,7 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$. Ma y col. utilizaron sec-butilditiofosfato (2-DBuDPA) y citrato como agente enmascarante para cuantificar este analito en muestras biológicas y medioambientales en medio ácido¹⁰⁶. Los autores han indicado un límite de detección para cinc de $0,5 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$. Empleando dietilditiocarbamato sódico (NaDDTC) para la formación de los complejos metálicos y Amberlita XAD-2000 como adsorbente se ha alcanzado un límite de detección de $0,15 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ para cinc¹⁰⁷. Un límite de detección aún más bajo, $0,05 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, con un factor de preconcentración de 200, se indica en los trabajos realizados por Li y col. utilizando trifenilmetano microcristalino cargado con verde de malaquita para separar y preconcentrar el analito¹⁰⁸. También, utilizando la preconcentración *on-line* en sistemas en flujo, Lemos y col. obtuvieron un límite de detección de $0,37 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ empleando columnas empaquetadas con poliuretano y cargadas con 2-[2'-(6-metilbenzotiazolil-azo)]-4-bromofenol (Me-BTABr)¹⁰⁹. Empleando el mismo tipo de columna pero con PAR como complejante, dos Santos y col. obtuvieron un límite de detección $0,28 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ de cinc¹¹⁰. Tuzen y Soylak han usado ditizona como agente complejante de cadmio, cobre, cobalto, hierro, plomo, níquel y cinc en muestras acuosas (río, mar, potable) y la resina Diaion HP-2MG como adsorbente de los complejos formados¹¹¹. Con este sistema obtuvieron un factor de preconcentración de 375 para todos los cationes y un

¹⁰⁵ Giokas, D.L.; Paleologos, E.K.; Prodromidis, M.I.; Karayannis, M.I. Development of 1-(2-pyridylazo)-2-naphthol-modified polymeric membranes for the effective batch pre-concentration and determination of zinc traces with flame atomic absorption spectrometry. *Talanta*, 56, 491, 2002.

¹⁰⁶ Ma, R.; van Mol, W.; Adams, F. Flow injection sorbent extraction with dialkyldithiophosphates as chelating agent for the determination of zinc by flame atomic absorption spectrometry. *Anal. Chim. Acta*, 309, 395, 1995.

¹⁰⁷ Bulut, V.N.; Gundogbu, A.; Duran, C.; Senturk, H.B.; Soylak, M.; Elci, L.; Tufekci, M. A multi-element solid-phase extraction method for trace metals determination in environmental samples on Amberlite XAD-2000. *J. Hazard. Mat.*, 146, 155, 2007.

¹⁰⁸ Li, Q.; Zhao, X.; Lv, Q.; Liu, G. The determination of zinc in water by flame atomic absorption spectrometry after its separation and preconcentration by malachite green loaded microcrystalline triphenylmethane. *Sep. Purif. Technol.*, 55, 76, 2007.

¹⁰⁹ Lemos, V.A.; dos Santos, W.N.; Silva, J.; Becerra, M. On-line preconcentration system using a minicolumn of polyurethane foam loaded with Me-BTABr for zinc determination by flame atomic absorption spectrometry. *Anal. Chim. Acta*, 481, 283, 2003.

¹¹⁰ dos Santos, W.N.; Santos, C.M.C.; Ferreira, S.L.C. Application of three-variables Doehlert matrix for optimisation of an on-line pre-concentration system for zinc determination in natural water samples by flame atomic absorption spectrometry. *Microchem. Journal*, 75, 211, 2003.

¹¹¹ Tuzen, M.; Soylak, M. Column system using diaion HP-2MG for determination of some metal ions by flame atomic absorption spectrometry. *Anal. Chim. Acta*, 504, 325, 2004.

límite de detección para cinc de $0,14 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$. También se han empleado las resinas tipo Amberlita, como se indica en los trabajos realizados por Liu y col. para la separación y preconcentración *on-line* de cadmio, cobalto, cobre y cinc en muestras acuosas¹¹². Los autores retenían los analitos en forma de complejos con 2,6-dihidroxifenil-diazoaminoazobenceno sobre una microcolumna rellena con Amberlita XAD-4 impregnada con el reactivo. La frecuencia de muestreo que conseguían con este sistema era de 30 muestras/hora y alcanzaron un límite de detección para cinc de $0,2 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$. Un sistema también interesante para la preconcentración de cinc en agua de mar directamente en la etapa de muestreo es el que se propone por Yebra-Biurrun y Cespón-Romero¹¹³. La muestra de agua de mar se bombea directamente hacia una minicolumna empaquetada con una resina que contiene grupos aminometilfosfónicos (Chelita P) en la que queda retenido el analito. Una vez en el laboratorio, las minicolumnas se insertan en un sistema FIA donde el analito se eluye con ácido clorhídrico y se analiza directamente. Con este sistema se obtuvo un límite de detección de $0,02 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ de cinc.

Huang y Shih han determinado directamente por ETAAS la concentración de cinc en agua de mar mediante adición patrón y ácido cítrico como modificador¹¹⁴. En las condiciones optimizadas obtuvieron un límite de detección de $0,11 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, el cual consiguieron reducir hasta $0,024 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ empleando vanadio como modificador. También para la determinación directa de cinc en diferentes tipos de aguas (potable, mar, residuales y de irrigación), Terrés y col. han indicado un límite de detección de $0,247 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ empleando magnesio como modificador¹¹⁵.

Empleando la *espectroscopia de emisión de plasma*, Zheng y col. han cuantificado cobre, plomo, cinc y cadmio en muestras biológicas y de aguas naturales

¹¹² Liu, Y.; Guo, Y.; Meng, S.; Chang, X. Online separation and preconcentration of trace heavy metals with 2,6-dihydroxyphenyl-diazoaminoazobenzene impregnated amberlite XAD-4. *Microchim. Acta*, 158, 239, 2007.

¹¹³ Yebra-Biurrun, M.; Cespón-Romero, R. Minicolumn field sampling-preconcentration of trace zinc from seawater and its laboratory detection by flow injection flame atomic absorption spectrometry. *Anal. Sci.*, 22, 51, 2006.

¹¹⁴ Huang, S.; Shih, K. Direct determination of zinc in seawater by graphite furnace atomic absorption spectrometry. *Spectrochim. Acta*, 50B, (8), 837, 1995.

¹¹⁵ Terrés, C.; Navarro, M.; Martín, F.; Jiménez, R.; López, H.; López, M.C. Determination of zinc levels in waters from southeastern Spain by electrothermal atomic absorption spectrometry: relationship with industrial activity. *Water Res.*, 36, 1912, 2002.

CAPÍTULO 1

(río, lago)¹¹⁶. Los analitos se preconcentraban sobre una microcolumna de dietilditiocarbamato impregnado sobre dióxido de titanio y posteriormente se eluían con ácido clorhídrico. El límite de detección para cinc fue de $0,39 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ en las condiciones óptimas. Mejores límites de detección para cinc, $0,02 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, se indican en los trabajos realizados por Katarina y col. para la preconcentración *on-line* de cinc y otros doce elementos en aguas naturales¹¹⁷. Los autores desarrollaron un sistema automatizado para el pretratamiento de la muestra en el que los analitos quedaban retenidos en una mini-columna empaquetada con Muromac A-1 (iminodiacetato sódico) y posteriormente eran eluidos por una disolución de ácido nítrico.

Se ha empleado la técnica ICP-MS para la especiación multielemental de cinc y otros elementos en aguas naturales, como se recoge en los trabajos realizados por Point y col.¹¹⁸. En éstos, los autores desarrollaron un sistema automatizado en el que las muestras eran sometidas a radiación UV *on-line* y posteriormente se preconcentraban en el propio lugar de muestreo antes de su análisis. Obtuvieron un límite de detección para cinc de $0,027 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$.

Para concluir, mencionaremos otros trabajos realizados para determinar cinc empleando técnicas instrumentales diferentes a las mencionadas anteriormente. Así, podemos citar los trabajos realizados por Jurado-González y col. para determinar el contenido de cinc, sodio, calcio y magnesio en agua potable por electroforesis capilar aplicando el diseño factorial¹¹⁹. En las condiciones óptimas, lograron un límite de detección para cinc de $32 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$. La misma técnica fue utilizada por Qu y col. para la separación simultánea de cinc y otros nueve cationes en diferentes tipos de muestras¹²⁰.

¹¹⁶ Zheng, H.; Chag, X.; Lian, N.; Wang, S.; Cui, Y.; Zhai, Y. A pre-enrichment procedure using diethyldithiocarbamate-modified TiO_2 nanoparticles for the analysis of biological and natural water samples by ICP-AES. *Intern. J. Environ. Anal. Chem.*, 86 (6), 431, 2006.

¹¹⁷ Katarina, R.K.; Lenghor, N.; Motomizu, S. On-line preconcentration method for the determination of trace metals in water samples using a fully automated pretreatment system coupled with ICP-AES. *Anal. Sci.*, 23, 343, 2007.

¹¹⁸ Point, D.; Bareille, G.; Pinaly, H.; Belin, C.; Donard, O.F.X. Multielemental speciation of trace metals in estuarine waters with automated on-site UV photolysis and resin chelation coupled to inductively coupled plasma mass spectrometry. *Talanta*, 72, 1207, 2007.

¹¹⁹ Jurado-González, J.A.; Galindo, M.D.; García, M. Factorial designs applied to the development of a capillary electrophoresis method for the analysis of zinc, sodium, calcium and magnesium in water samples. *Talanta*, 59, 775, 2003.

¹²⁰ Qu, F.; Lin, J.; Chen, Z. Simultaneous separation of nine metal ions and ammonium with nonaqueous capillary electrophoresis. *J. Chromatogr. A*, 1022, 217, 2004.

El límite de detección que alcanzaron para Zn, empleando capilares de 150 micras de diámetro interno, fue de $50 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$. También se ha empleado la fluorescencia de rayos X (EDXRF) para la determinación de cinc y otros elementos en agua de mar con buenos límites de detección, como se recogen en los trabajos de Melquiades y col. ($2 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)¹²¹ o Jiang y col. ($0,21 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)¹²².

3.3. Métodos de Análisis de Vanadio en Aguas Naturales

Del mismo modo que ocurre para cobre y cinc, la concentración de vanadio en aguas naturales se encuentra del orden de los $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ e inferior, en consecuencia, los métodos de análisis desarrollados para su determinación deben poseer una adecuada sensibilidad. En este sentido, existen en la bibliografía una gran cantidad de métodos analíticos descritos basados en la utilización de distintas técnicas instrumentales (electroquímicas, espectroscópicas, espectrofotométricas, etc.) para la determinación de su concentración en aguas naturales. No obstante, la mayoría de las muestras ambientales acuosas naturales requieren una etapa previa de concentración del analito.

3.3.1. Complejos orgánicos coloreados de vanadio. Para el análisis espectrofotométrico directo de vanadio en muestras acuosas se suelen utilizar 8-hidroxiquinoleína (8-HQ) y N-benzoíl-N-fenilhidroxilamina (BPHA) como agentes complejantes clásicos, determinándose vanadio(V) tras la extracción de los complejos formados en cloroformo^{123,124}. En el caso de vanadio(IV) se han empleado derivados del

¹²¹ Melquiades, F.L.; Parreira, P.S.; Yabe, M.J.; Corazza, M.Z.; Funfas, R.; Appoloni, C.R. Factorial design for Fe, Cu, Zn, Se and Pb preconcentration optimization with APDC and analysis with a portable X-ray fluorescence system. *Talanta*, 73, 121, 2007.

¹²² Jiang, Z.T.; Yu, J.C.; Liu, H.Y. Simultaneous determination of cobalt, copper and zinc by energy dispersive X-ray fluorescence spectrometry after preconcentration on PAR-loaded ion-exchange resin. *Anal. Sci.*, 21, 851, 2005.

¹²³ Marczenko, Z. *Spectrophotometric determination of elements. Capítulo 59*. John Wiley & Sons Inc., New York, 1976.

¹²⁴ Marczenko, Z.; Balcerzak, M. *Separation, preconcentration and spectrophotometry in inorganic analysis*. Elsevier, Amsterdam, 2000.

CAPÍTULO 1

trifenilmetano, como Violeta de Pirocatecol (PV), Cromo azurol S (CAS) o Eriocromo cianina R (ECR), en presencia de tensioactivos catiónicos¹²⁵.

Taylor y van Staden realizaron una revisión en la que se recogían los reactivos orgánicos más habituales para la determinación de vanadio(IV) y vanadio(V) en diferentes tipos de muestras basados en distintos tipos de reacciones (redox, formación de complejos, catalíticas y enzimáticas) así como los distintos métodos de separación empleados (HPLC, intercambio iónico, preconcentración, etc.)¹²⁶. Una revisión aún más reciente es la realizada por Pyrzynska, en la que se indican los métodos más interesantes para la determinación espectrofotométrica de vanadio¹²⁷.

Métodos Discontinuos

Métodos Directos

Abebaw y Chandravanshi han propuesto la determinación de vanadio(V) en diversos tipos de muestras (aceros, sangre y aguas)¹²⁸. Los autores empleaban el ácido N-fenil-cinamohidroxámico (PCHA) en presencia de los ácidos monocloraacético o tricloroacético para formar los complejos que se extraían en cloroformo antes de la medida espectrofotométrica. Obtuvieron coeficientes de absorptividad molar relativamente bajos, 6700 y 7750 L·mol⁻¹·cm⁻¹ con mono- y tricloroacético, respectivamente, en muestras sanguíneas. Para determinar la concentración de vanadio en aceros y muestras acuosas emplearon el mismo reactivo, PCHA, pero en presencia de azida¹²⁹. En esta ocasión, consiguieron mejorar el coeficiente de absorptividad molar, 9000 L·mol⁻¹·cm⁻¹. Spinola Costa y col. desarrollaron un método para determinar V(IV) basado en la oxidación de éste por Fe(III) y la posterior medida del complejo formado

¹²⁵ Jarosz, M.; Marczenko, K. Study of the formation of vanadium(IV) complexes with some triphenylmethane reagents and cationic surfactants. *Analyst*, 109, 35, 1984.

¹²⁶ Taylor, M.J.C.; van Staden, J.F. Spectrophotometric determination of vanadium(IV) and vanadium(V) in each other's presence. *Analyst*, 119, 1263, 1994.

¹²⁷ Pyrzynska, K. Recent developments in spectrophotometric methods for determination of vanadium. *Microchim. Acta*, 149, 159, 2005.

¹²⁸ Abebaw, A.; Chandravanshi, B.S. Extraction and spectrophotometric determination of vanadium(V) with N-phenylcinamohydroxamic acid and monochloroacetic acid or trichloroacetic acid. *Bull. Chem. Soc. Ethiop.*, 10 (2), 121, 1996.

¹²⁹ Abebaw, A.; Chandravanshi, B.S. Extraction and spectrophotometric determination of vanadium(V) with N-phenylcinamohydroxamic acid and azide. *Chem. Anal.*, 43 (1), 33, 1998.

entre el Fe(II) resultante y 2-(5-bromo-2-piridilazo)-5-dietilaminofenol (Br-PADAP)¹³⁰. Los autores obtuvieron un coeficiente de absortividad molar, $\epsilon = 2,8 \cdot 10^4 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$, y un límite de detección de $5,5 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$.

En otras ocasiones, se ha usado tetracloruro de carbono para extraer el complejo formado, como han empleado Agnihotri y col.¹³¹. Los autores usaron la 6-cloro-3-hidroxi-7-metil-2-(2-tienil)-4H-cromo-4-ona (CHMTC) como reactivo cromogénico para cuantificar la concentración de vanadio(V) en las muestras sin interferencias de la mayoría de cationes importantes y algunos aniones. Además, alcanzaron un valor elevado para el coeficiente de absortividad molar, $\epsilon = 8,26 \cdot 10^4 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$.

Otro compuesto orgánico que también se ha utilizado como agente extractante ha sido la acetona. Habitualmente ésta se adiciona en una relación del 50% (v/v) para extraer el complejo, como se indica en los trabajos realizados por Jamaluddin y Banoo para determinar vanadio en muestras de diferente composición (industriales, medioambientales, biológicas y suelos) empleando como reactivo cromogénico la 1,5-difenilcarbohidrazida (DPCH)¹³². Obtuvieron un límite de detección para vanadio de $20 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ y un coeficiente de absortividad molar de $4,32 \cdot 10^4 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$.

En otras ocasiones se han desarrollado métodos basados en la formación de complejos ternarios. Así, utilizando otro derivado del ácido hidroxámico, el N-fenilbenzohidroxámico (PBHA), Kamavisdar y Patel desarrollaron un método para determinar vanadio(V) en aguas residuales industriales¹³³. El complejo formado por PBHA, yodato potásico y violeta cristal se extraía en cloroformo y se determinaba la concentración del analito en la fase orgánica. El coeficiente de absortividad molar y límite de detección que obtuvieron fueron de $7200 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ y $44 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$, respectivamente. Un valor para el coeficiente de absortividad molar superior, $\epsilon = 2,4 \cdot 10^4 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$, se indica en los trabajos desarrollados por Gavazov y col. para cuantificar

¹³⁰ Spinola Costa, A.C.; Teixeira, L.S.G.; Valli Jaeger, H.; Ferreira, S.L.C. Spectrophotometric determination of vanadium(IV) in the presence of vanadium(V) using Br-PADAP. *Microchim. Acta*, 130, 41, 1998.

¹³¹ Agnihotri, N.; Dass, R.; Mehta, J.R. A highly sensitive and selective spectrophotometric determination of vanadium(V) using 6-chloro-3-hydroxy-7-methyl-2-(2-thienyl)-4H-chromen-4-one. *Anal. Sci.*, 15, 1261, 1999.

¹³² Jamaluddin, M.; Banoo, S. Spectrophotometric method for determination of vanadium and its application to industrial, environmental, biological and soil samples. *Talanta*, 48, 1085, 1999.

¹³³ Kamavisdar, A.; Patel, K.S. Extraction spectrophotometric determination of vanadium in industrial waste water. *J. Chin. Chem. Soc.*, 47 (5), 1161, 2000.

CAPÍTULO 1

vanadio(V) en muestras acuosas y aleaciones¹³⁴. El método se basa en la formación de un complejo de asociación iónica ternario entre el analito, PAR y cloruro de 2-(4-yodofenil-3-(4-nitrofenil)-5-feniltetrazolio), (INT). Para eliminar interferencias utilizan fluoruro amónico (NH₄F) y ácido 1,2-diaminociclohexano tetraacético (CDTA). Para determinar vanadio(IV), Starczewska ha propuesto dos métodos basados en la formación de complejos ternarios entre el analito, Cromo azurol S (CAS) y cloruro de imipramina (IMI) o cloruro de clorpromacina (CPX)¹³⁵. El intervalo de linealidad para ambos sistemas fue de 0,17-1,7 mg·L⁻¹ de vanadio(IV), con valores de absorptividad molar de $1,2 \cdot 10^4$ L·mol⁻¹·cm⁻¹ y $1,5 \cdot 10^4$ L·mol⁻¹·cm⁻¹ para V(IV)-CAS-IMI y V(IV)-CAS-CPX, respectivamente. Para eliminar las interferencias de diversos cationes se adicionaban fluoruro, citrato y tiourea.

También se ha utilizado la espectrofotometría de derivadas para determinar vanadio(V) en muestras acuosas, como se recoge en los trabajos realizados por Abbas y col.¹³⁶. Los autores empleaban la formación de complejos ternarios entre los analitos, PAR y cloruro de cetilpiridinio (CPC) como tensioactivo para la determinación simultánea de uranio(VI) y vanadio(V) empleando la primera derivada del espectro. Para eliminar las interferencias adicionaban AEDT, obteniendo valores muy bajos tanto para la absorptividad molar como para el límite de detección, $\epsilon = 2,8 \cdot 10^3$ L·mol⁻¹·cm⁻¹ y 3 mg·L⁻¹, respectivamente. En los trabajos realizados por Abbaspour y Mirzajani se utiliza la técnica de la corrección espectral (corrección- β) y las redes neuronales para la determinación simultánea de vanadio(V) y aluminio(III) en muestras sintéticas, aleaciones y agua potable¹³⁷. El reactivo que empleaban para la formación de los respectivos complejos era Rojo de Alizarina S (ARS). Estos mismos autores utilizaron la corrección- β y mínimos cuadrados parciales (PLS) para determinar simultáneamente vanadio(IV) y vanadio(V) en diferentes tipos de muestras acuosas (río, mineral,

¹³⁴ Gavazov, K.; Simeonova, Z.; Alexandrov, A. Extraction spectrophotometric determination of vanadium in natural waters and aluminium alloys using pyridyl azo resorcinol (PAR) and iodo-nitro-tetrazolium chloride (INT). *Talanta*, 52, 539, 2000.

¹³⁵ Starczewska, B. Spectrophotometric determination of vanadium(IV) by ternary complexes of chrome azurol S with imipramine and chlorprothixene. *J. Trace and Microprobe Techn.*, 20 (3), 377, 2002.

¹³⁶ Abbas, M.N.; Homoda, A.M.; Mostafa, G.A.E. First derivative spectrophotometric determination of uranium(VI) and vanadium(V) in natural and saline waters and some synthetic matrices using PAR and cetylpyridinium chloride. *Anal. Chim. Acta*, 436, 223, 2001.

¹³⁷ Abbaspour, A.; Mirzajani, R. Application of the spectral correction method and "neural networks" for simultaneous determination of V(V) and Al(III). *Talanta*, 64, 435, 2004.

residual, potable) con buenos resultados¹³⁸. En esta ocasión utilizaban Rojo de Pirogalol (PGR) como reactivo y el tensioactivo bromuro de cetiltrimetilamonio (CTAB) para evitar la reacción de oxidación que tenía lugar entre V(V) y PGR, garantizando así la estabilidad del complejo formado entre ambos.

Métodos catalíticos

Se ha utilizado el efecto catalítico de ambas especies de vanadio en la oxidación de diferentes reactivos orgánicos para el desarrollo de métodos cinéticos. En este sentido, Ensafi y col. utilizaron el efecto catalítico de vanadio(V) en la reacción de oxidación de Azul Nilo por bromato para determinar trazas de vanadio en muestras acuosas y de leche¹³⁹. El principal inconveniente del método era la fuerte influencia de las interferencias. Este problema no ocurría en los estudios realizados por Gao y col., en el que utilizaban la oxidación de la metanoimina por bromato en presencia de vanadio(V) como catalizador¹⁴⁰. En estas condiciones, alcanzaron un límite de detección de $0,2 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$. Otro método también prácticamente libre de interferencias se ha indicado para la reacción de oxidación de Azul de anilina por bromato en presencia de V(IV) como catalizador¹⁴¹. Para cuantificar el analito empleaban el método de tiempo fijo, midiendo el descenso de absorbancia que se producía en el reactivo desde 0,5-5 minutos desde que se iniciaba la reacción. La presencia de vanadio(V) en una relación en peso respecto de vanadio(IV) de hasta 700 no interfiere en la reacción. El límite de detección que alcanzaron fue de $2 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$. Un valor más bajo para este parámetro, $0,014 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, se indica en los trabajos realizados por Zhai y col. en la cuantificación de vanadio(V) en

¹³⁸ Abbaspour, A.; Mirzajani, R. Application of spectral β -correction method and partial least squares for simultaneous determination of V(IV) and V(V) in surfactant media. *Spectrochim. Acta, Part A*, 64, 646, 2006.

¹³⁹ Ensafi, A.A.; Amini, M.K.; Mazloun, M. Spectrophotometric reaction rate method for the determination of trace amounts of vanadium(V) by its catalytic effect on the oxidation of Nile Blue with bromate. *Anal. Lett.*, 32 (9), 1927, 1999.

¹⁴⁰ Gao, J.Z.; Zhang, X.; Zhao, B.W.; Yang, W.; Zhao, Y.C.; Yuang, L.; Wang, X.W.; Kang, J.W. Spectrophotometric determination of trace amounts of vanadium(V) by means of its catalytic effect on oxidation of azomethine-H by bromate. *Rare metals*, 19 (2), 123, 2000.

¹⁴¹ Safavi, A.; Hormozi Nezhad, M.R.; Shams, E. Highly selective and sensitive kinetic spectrophotometric determination of vanadium(IV) in presence of vanadium(V). *Anal. Chim. Acta*, 409, 283, 2000.

CAPÍTULO 1

muestras acuosas de diferente composición¹⁴². Los autores utilizaron el efecto catalítico de vanadio(V) en la oxidación de p-acetilarsenazo con bromato en un medio fosfórico y en presencia de ácido cítrico. El valor de absorptividad molar que lograron fue muy elevado, $\epsilon = 2,64 \cdot 10^6 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$. Kiran Kumar y Revanasiddappa han desarrollado un método catalítico aplicable a muestras de muy diferente composición: aceros, productos farmaceuticos, aguas, suelos y biológicas¹⁴³. El método está basado en la oxidación de Azul de Variamina por vanadio(V) y la posterior medida de la absorbancia del aducto formado. El límite de detección que obtuvieron para el analito fue de $10 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ y el valor de absorptividad molar $\epsilon = 1,65 \cdot 10^4 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$.

Recientemente se están empleando las reacciones de acoplamiento oxidativo. Éstas consisten en la formación de un compuesto coloreado como consecuencia de la reacción catalizada por vanadio entre dos compuestos orgánicos. En este sentido, Krishna Priya y col. han propuesto dos reacciones de acoplamiento oxidativo catalizadas por vanadio(V) para cuantificar su concentración en muestras de diferente composición (aguas naturales, plantas, suelos, sintéticas, biológicas y farmaceuticas)¹⁴⁴. Ambas están basadas en la reacción de oxidación de 2,4-dinitrofenil hidracina (2,4-DPNH) o 4-amino piridina (4-AP) por vanadio(V) y su posterior acoplamiento con cloruro de N-(1-naftil) etilendiamina (NEDA). Los límites de detección que obtuvieron fueron $0,358 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ y $0,704 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ para los sistemas 2,4-DPNH-NEDA y 4-AP-NEDA, respectivamente. Límites de detección similares se han obtenido empleando diferentes compuestos acoplados a NEDA, tales como 4-bromofenil hidracina (4-BPH)¹⁴⁵ ó 4-aminoantipirina (4-AAP)¹⁴⁶.

¹⁴² Zhai, Q.Z.; Jiang, T.S.; Yuan, K.Y.; Hu, W.H.; Wang, W.; Zhao, R.X. Study on catalytic kinetic spectrophotometric system of V(V)-ASApA-KBrO₃ and its application. *Rare metal materials and engineering*, 33 (2), 222, 2004.

¹⁴³ Kiran Kumar, T.N.; Revanasiddappa, H.D. Spectrophotometric determination of vanadium using variamine blue and its application to synthetic, environmental and biological samples. *J. Iranian Chem. Soc.*, 2 (2), 161, 2005.

¹⁴⁴ Krishna Priya, B.; Subrahmanyam, P.; Dilip Kumar, J.; Chiranjeevi, P. Simple sensitive spectrophotometric determination of vanadium in biological and environmental samples. *E-J. Chem.*, 3 (13), 286, 2006.

¹⁴⁵ Rekha, D.; Suvardhan, K.; Suresh, Kumar, K.; Subrahmanyam, P.; Jayaraj, B.; Ramakrishna Naidu, G.; Chiranjeevi, P. Spectrophotometric determination of V(V) in environmental, biological, pharmaceutical and alloy samples by novel oxidative coupling reactions. *J. Haz. Mat.*, 140, 180, 2007.

¹⁴⁶ Suresh Kumar, K.; Suvardhan, K.; Krishnaiah, L.; Rehka, D.; Kiran, K.; Janardhanam, K.; Jayaraj, B.; Chiranjeevi, P. Development of novel reactions for the simple and sensitive spectrophotometric determination of vanadium in various samples. *Talanta*, 71, 588, 2007.

Métodos con Preconcentración

Como ya se ha mencionado anteriormente, la necesidad de utilizar métodos de preconcentración diferentes a la extracción líquido-líquido surge como consecuencia de las bajas concentraciones en las que suele encontrarse el analito en muestras naturales. Así, Boudra y col. desarrollaron un método en el que el complejo formado con Eriocromo cianina R (ECR), tras reducir el V(V) con ácido ascórbico se adsorbía sobre un intercambiador aniónico, Sephadex DEAE A-25¹⁴⁷. En las condiciones óptimas y para un litro de muestra, obtuvieron un límite de detección de $0,6 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$. Un método similar se encuentra en los trabajos realizados por Fernández y col.¹⁴⁸. En esta ocasión se utilizaba una resina de intercambio iónico (Dowex 1-X8) y PAR como reactivo cromogénico. El límite de detección que obtuvieron así como la absortividad molar fueron de $18 \text{ ng}\cdot\text{L}^{-1}$ y $2,1\cdot 10^8 \text{ L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$, respectivamente. No obstante, el tiempo requerido para llevar a cabo todas las operaciones necesarias (agitación, filtración, centrifugación, etc.) antes de proceder a la medida era bastante largo. Otro método igualmente tedioso se encuentra en los trabajos desarrollados por Amin, en el que empleaba la misma resina que en el caso anterior (Dowex 1-X8) pero el reactivo cromogénico era 2,3-dicloro-6(3-carboxi-2-hidroxinaftilazo)quinoxalina (DCHNQ)¹⁴⁹. En las condiciones óptimas para un litro de muestra, el límite de detección y el coeficiente de absortividad molar fueron $9 \text{ ng}\cdot\text{L}^{-1}$ y $2,32\cdot 10^8 \text{ L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$, respectivamente. También empleando un litro de muestra, Li y col. obtuvieron un límite de detección para vanadio(V) de $23 \text{ ng}\cdot\text{L}^{-1}$ con un factor de preconcentración de 200¹⁵⁰. El método se basaba en la preconcentración del analito sobre trifenilmetano microcristalino cargado con violeta cristal y la posterior medida espectrofotométrica del complejo adsorbido.

¹⁴⁷ Boudra, S.; Bosque-Sendra, J.M.; Valencia, M.C. Determination of vanadium by solid-phase spectrophotometry after its preconcentration as an Eriochrome Cyanine R complex on a dextran-type exchanger. *Talanta*, 42, 1525, 1995.

¹⁴⁸ Fernández, M.L.; Molina, A.; Pascual, M.I.; Capitán, L.F. Solid-phase spectrophotometric determination of trace amounts of vanadium at sub-ng/mL level with 4-(2-pyridilazo)resorcinol. *Talanta*, 42, 1057, 1995.

¹⁴⁹ Amin, A.S. Solid-phase spectrophotometric determination of trace amounts of vanadium using 2,3-dichloro-6(3-carboxy-2-hydroxymaphtylazo)quinoxaline. *Spectrochim. Acta Part A*, 59, 1025, 2003.

¹⁵⁰ Li, Q.; Zhao, X.; Jiang, K.; Liu, G. The study of preconcentration and separation of vanadium(V) using microcrystalline triphenylmethane loaded with crystal violet and the determination of vanadium(V) in water samples by spectrophotometry. *Microchim. Acta*, 158, 123, 2007.

CAPÍTULO 1

En otras ocasiones se ha empleado la técnica de la flotación del complejo formado mediante la adición de un tensioactivo apropiado. Un ejemplo de ésta se encuentra en los trabajos realizados por Akl y col. para determinar V(IV) en muestras de diferente composición¹⁵¹. Los autores formaban el complejo con 1-(2-hidroxi-4-metoxibenzofenona)-4-feniltiosemicarbazona (MBTH) y ácido oléico (HOL) como tensioactivo, adicionando tiosulfato y/o un exceso de reactivo para eliminar las interferencias.

Actualmente se siguen desarrollando métodos espectrofotométricos orientados a la preconcentración, separación y especiación de vanadio en aguas naturales. En primer lugar, mediante resinas de intercambio iónico se consigue separar y preconcentrar el analito y, posteriormente, se determina la concentración de las dos especies predominantes de vanadio en muestras acuosas mediante la medida espectrofotométrica de los complejos formados. Así, Bosque y col., utilizan como resina Sephadex DEAE A-25 para separar y preconcentrar los complejos formados con Eriocromo cianina R (ECR)¹⁵². En las condiciones óptimas, obtuvieron un límite de detección para V(IV) y V(V) de $1,6 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ y $1,4 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, respectivamente. Un límite de detección similar para vanadio(V), de $1,6 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, se indica en los trabajos realizados por Filik y col.¹⁵³. En éstos, se utilizaba la resina Amberlita XAD-2 enlazada con el reactivo palmitoil 8-quinolinol para preconcentrar y separar vanadio de la matriz de la muestra en la columna. Tras su elución, se formaba el complejo del analito con PAR utilizando CDTA como enmascarante de V(IV).

Métodos en Continuo. Análisis por Inyección en Flujo (FIA)

Los métodos espectrofotométricos expuestos hasta el momento presentan una serie de inconvenientes que, en determinadas circunstancias, pueden hacer que su

¹⁵¹ Akl, M.A.; El-Asmy, A.A.; Yoseef, W.M. Separation *via* flotation, spectrophotometric speciation, and determination of vanadium(IV) in wastes of power stations. Anal. Sci., 21, 1325, 2005.

¹⁵² Bosque, J.M.; Valencia, M.C.; Boudra, S. Speciation of vanadium(IV) and vanadium(V) with Eriochrome Cyanine R in natural waters by solid phase spectrophotometry. Fresenius J. Anal. Chem., 360, 31, 1998.

¹⁵³ Filik, H.; Berker, K.I.; Balkis, N.; Apak, R. Simultaneous preconcentration of vanadium(V/IV) species with palmitoyl quinolin-8-ol bonded on amberlite XAD-2 and their separate spectrophotometric determination with 4-(2-pyridylazo)-resorcinol using CDTA as masking agent. Anal. Chim. Acta, 518, 173, 2004.

aplicación no sea posible. Entre éstos pueden citarse, entre otros, el elevado volumen tanto de muestra como de reactivos necesarios en algunos casos, su excesiva manipulación, tiempos de reacción excesivamente largos, la necesidad de mezclar los reactivos a intervalos de tiempo perfectamente controlados como ocurre en los métodos catalíticos, etc. Todos estos factores pueden reducirse o incluso eliminarse empleando la técnica del análisis por inyección en flujo (FIA).

Métodos Directos

Palomeque y col. han determinado la concentración de vanadio(V) en aguas naturales, utilizando como reactivo cromogénico 3,3'-trimetil-naftidina (3,3'-DMN) en medio ácido y la técnica del flujo detenido para el desarrollo de la reacción, obtuvieron un límite de detección de $190 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ y una frecuencia de muestreo de 34 muestras a la hora¹⁵⁴. Mejores resultados, tanto para el límite de detección, $1 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, como para la frecuencia de muestreo (40 muestras a la hora), han indicado Yamane y Yamaguchi en la determinación de la concentración de vanadio en aguas de río¹⁵⁵. Los autores utilizaron como reactivo cromogénico 2-(5-nitro-2-piridilazo)-5-(N-propil-N-sulfopropilamino)fenol (Nitro-PAPS), formándose el complejo del analito en un medio fuertemente ácido. La presencia de cobalto, níquel y cobre en la muestra provocaban interferencias que se podían eliminar tras la adición de N-(ditio-carboxi)sarcosina como agente enmascarante.

Métodos catalíticos

También, se ha utilizado el efecto catalítico de vanadio para desarrollar métodos FIA. Así, Yamane y col. emplearon el efecto catalítico de vanadio en la reacción de oxidación del ácido cromotrópico por bromato para determinar su concentración en

¹⁵⁴ Palomeque, M.E.; Lista, A.G.; Fernández, B.S. Determination of V(V) by a kinetic stopped-flow FIA method with spectrophotometric detection. *Anal. Chim. Acta*, 366, 287, 1998.

¹⁵⁵ Yamane, T.; Yamaguchi, Y. 2-(5-nitro-2-pyridylazo)-5-(N-propyl-N-sulfopropylamino)phenol as a new analytical reagent for flow-injection spectrophotometric determination of trace vanadium(V). *Mikrochim. Acta*, 130 (1-2), 111, 1998.

CAPÍTULO 1

aguas de ríos y costeras¹⁵⁶. Previamente, el analito pasaba a través de una columna (Sephadex G-25) donde se separaba y preconcentraba antes de actuar en la reacción de oxidación. En las condiciones óptimas obtuvieron un límite de detección de 20 ng·L⁻¹. No obstante, este sistema presentaba algunos inconvenientes, entre los que cabe destacar el empleo de tubos excesivamente largos, tiempo de preconcentración para el analito relativamente elevado (6 minutos), o la necesidad de controlar la temperatura de la reacción empleando un baño termostatzado a 35°C. Se ha intentado mejorar la sensibilidad y selectividad de las reacciones catalizadas por vanadio mediante la adición al sistema de compuestos que actúan como activadores. En este sentido, Zhang y col. emplearon el ácido cítrico como activador de la reacción de oxidación del Azul Victoria B por bromato catalizada por vanadio¹⁵⁷. En las condiciones óptimas lograron un límite de detección de 0,5 µg·L⁻¹ así como una frecuencia de análisis de 15 muestras a la hora. La misma frecuencia de análisis pero con un límite de detección bastante mejor (10 ng·L⁻¹), se indica en los trabajos realizados por Shiobara y col. para determinar vanadio en aguas naturales¹⁵⁸. El método estaba basado en la adición de ácido sulfosalicílico como activador de la reacción de oxidación de N-(3-sulfopropil)-3,3',5,5'-tetrametilbencidina por bromato catalizada por vanadio. Una ligera mejora en cuanto al límite de detección y la frecuencia de análisis, 8 ng·L⁻¹ y 30 muestras a la hora, respectivamente, se encuentra en los trabajos realizados por Nakano y col. para cuantificar vanadio en muestras acuosas¹⁵⁹. En esta ocasión el activador que utilizaron para la reacción de oxidación de N,N'-bis(2-hidroxil-3-sulfopropil)toluidina por bromato catalizada por vanadio fue el 1,2-dihidroxibenceno-3,5-disulfonato. Kawakubo y col. obtuvieron un límite de detección de 4 ng·L⁻¹ y una frecuencia de 30 muestras a la

¹⁵⁶ Yamane, T.; Osada, Y.; Suzuki, M. Continuous flow system for the determination of trace vanadium in natural waters utilizing in-line preconcentration/separation coupled with catalytic photometric detection. *Talanta*, 45, 583, 1998.

¹⁵⁷ Zhang, Z.Q.; Liu, X.P.; Zhan, H.Y. Flow injection catalytic determination of vanadium using the indicator reaction between Victoria blue B and bromate and a citric acid activator. *Anal. Lett.*, 32 (10), 2115, 1999.

¹⁵⁸ Shiobara, T.; Teshima, N.; Kurihara, M.; Nakano, S.; Kawashima, T. Catalytic flow injection determination of vanadium by oxidation of N-(3-sulfopropyl)-3,3',5,5'-tetramethylbenzidine using bromate. *Talanta*, 49, 1083, 1999.

¹⁵⁹ Nakano, S.; Tanaka, E.; Mizutani, Y. Flow-injection spectrophotometry of vanadium by catalysis of the bromate oxidation of N,N'-bis(2-hydroxyl-3-sulfopropyl)-tolidine. *Talanta*, 61, 203, 2003.

hora para valorar vanadio en muestras acuosas naturales¹⁶⁰. El método que desarrollaron consistía en la adición de ácido gálico como activador de la reacción de oxidación de o-fenilendiamina por bromato catalizada por vanadio a 50°C.

Teshima y col. han desarrollado un nuevo método para la determinación de trazas de vanadio en muestras acuosas basado en la oxidación catalítica de p-anisidina por vanadio empleando Tiron como activador¹⁶¹. Los autores proponen una nueva alternativa a la técnica de flujo detenido, que consiste en dejar que transcurra la reacción en el canal de la muestra (loop) (SIL-FA) durante un determinado periodo de tiempo, transcurrido el cual el producto de la reacción se dirige hacia el detector donde es medido. En el sistema desarrollado, eran necesarios 280 segundos para que tuviera lugar el ciclo completo, manteniendo durante 180 segundos el flujo detenido en el *loop* de muestra y éste a 95° para que procediera la reacción. En las condiciones optimizadas obtuvieron un límite de detección para vanadio de 10 ng·L⁻¹.

Métodos de Preconcentración

Se mencionarán trabajos basados en la preconcentración del analito en el sistema FIA. Así, Palomeque y col. modificaron el sistema FIA desarrollado introduciendo una mini-columna de intercambio (Chelex 100) en la posición del bucle de muestra para la preconcentración y separación del analito¹⁵². En estas condiciones, lograron un límite de detección aproximadamente 6 veces mejor, 32 µg·L⁻¹, aunque presentaba el inconveniente de disminuir la frecuencia de muestreo hasta 12 muestras a la hora. En otras ocasiones, la resina se sitúa en la propia celda, como proponen Ayora y col. para evaluar vanadio en diferentes tipos de muestras¹⁶². Los autores utilizaron la preconcentración *on-line* del complejo formado con el ácido 5-bromosalicilhidroxámico sobre una resina aniónica situada en la celda. El límite de detección obtenido por este método fue de 14 µg·L⁻¹ con una frecuencia de análisis de 10 a 15 muestras a la hora.

¹⁶⁰ Kawakubo, S.; Kajihara, K.J.; Iwatsuki, M. Catalytic spectrophotometric determination of picogram amounts of vanadium in natural fresh and tap water by flow injection analysis. *Anal. Sci.*, 12 (2), 237, 1996.

¹⁶¹ Teshima, N.; Ohno, S.; Sakai, T. Stopped-in-loop flow analysis of trace vanadium in water. *Anal. Sci.*, 23, 1, 2007.

¹⁶² Ayora, M.J.; Molina, A.; Pascual, M.I. Determination of vanadium by solid-phase spectrophotometry in a continuous flow system. *Internat. J. Environ. Anal. Chem.*, 76 (4), 319, 2000.

CAPÍTULO 1

Un sistema complejo para la separación, preconcentración y especiación de vanadio en aguas naturales es el desarrollado por Okamura y col.¹⁶³. Éste se encuentra formado por dos unidades, en la primera de ellas ambas especies de vanadio quedan retenidas en sendas resinas quelatantes (de acetilacetona para vanadio(V) y de 8-quinolinol para vanadio(IV)). En la segunda, se emplea el flujo de aire segmentado para determinar la concentración de vanadio eluido de las resinas haciendo uso del efecto catalítico que presenta en la reacción de oxidación de Verde de Bindschedler por bromato.

3.3.2. Otros Métodos. Entre las diferentes *técnicas electroquímicas*, la voltametría de redisolución por adsorción tanto anódica como catódica ha sido de las que más se ha empleado para la determinación de vanadio en aguas naturales. Así, Greenway y Wolfbauer utilizaron cupferron para formar el complejo con vanadio y a continuación se producía su reducción catalítica en presencia de bromato y se calculaba su concentración¹⁶⁴. Para un tiempo de deposición de 90 segundos obtuvieron un límite de detección de $8 \text{ ng}\cdot\text{L}^{-1}$. Mejores resultados obtuvieron Li y Smart mediante voltametría de redisolución empleando el electrodo de gotas de mercurio (HMDE)¹⁶⁵. Los autores formaban el complejo de vanadio con 2,3-dihidroxinaftaleno en presencia de bromato como catalizador alcanzando, en las condiciones óptimas, un límite de detección de $0,76 \text{ ng}\cdot\text{L}^{-1}$. También, utilizando el electrodo de gotas de mercurio (HMDE), Bobrowski y col. desarrollaron un método polarográfico de pulso diferencial y otro voltamétrico de redisolución por adsorción empleando el efecto catalítico de bromato, para determinar la concentración de vanadio en aguas naturales¹⁶⁶. El reactivo que utilizaban para formar el complejo era el ácido cloroanílico y, en las condiciones optimizadas, obtuvieron límites de detección de $0,14 \text{ }\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ y $0,46 \text{ ng}\cdot\text{L}^{-1}$ para los métodos polarográfico y voltamétrico, respectivamente.

¹⁶³ Okamura, K.; Sugiyama, M.; Obata, H.; Maruo, M.; Nakayama, E.; Karatani, H. Automated determination of vanadium(IV) and (V) in natural waters based on chelating resin separation and catalytic detection with Bindschedler's green leuco base. *Anal. Chim. Acta*, 443, 143, 2001.

¹⁶⁴ Greenway, G.M.; Wolfbauer, G. On-line determination of vanadium by adsorptive stripping voltammetry. *Anal. Chim. Acta*, 312, 15, 1995.

¹⁶⁵ Li, H.; Smart, R.B. Catalytic stripping voltammetry of vanadium in the presence of dihydroxynaphthalene and bromate. *Anal. Chim. Acta*, 333, 131, 1996.

¹⁶⁶ Bobrowski, A.; Nowak, K.; Zarebski, J. Novel voltammetric methods for vanadium determination by exploitation of catalytic adsorptive vanadium-chloroanilic acid-bromate system. *Anal. Chim. Acta*, 543, 150, 2005.

En el análisis de vanadio por *espectroscopia de absorción atómica de llama*, debido a las bajas concentraciones en las que suele encontrarse en aguas naturales, habitualmente es necesario realizar un paso previo de preconcentración que permita su cuantificación por FAAS. Así, Chakrapani y col. utilizaron la preconcentración de los complejos metálicos formados con PAR absorbidos sobre carbono activo para determinar V y otros elementos metálicos en aguas subterráneas¹⁶⁷. El límite de detección que obtuvieron para vanadio fue de $0,14 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$. Una mejora evidente en cuanto al límite de detección, $1,1 \text{ }\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, se indica en los trabajos realizados por Román y col. para determinar los contenidos de varios elementos metálicos en muestras medioambientales y biológicas¹⁶⁸. En éstos, preconcentran vanadio utilizando ditiocarbamatos y metil isobutil cetona antes de realizar la medida espectroscópica.

En el caso de la *espectroscopia de absorción atómica en horno de grafito*, la determinación de vanadio en muestras acuosas presenta como principales inconvenientes la formación de carburos de vanadio térmicamente estables así como las interferencias causadas por las matrices con contenidos elevados de cloruros. Por tanto, los trabajos desarrollados se han encaminado fundamentalmente hacia la solución de los problemas mencionados anteriormente. En este sentido, Thomaidis y Piperaki evaluaron la eficacia de distintos modificadores de matriz para solucionar los problemas causados por la muestra¹⁶⁹. Encontraron que utilizando Pt como modificador se obtenían resultados adecuados, indicando un límite de detección para vanadio de $0,44 \text{ }\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$. En otras ocasiones se ha utilizado la corrección Zeeman y el método de las adiciones patrones para determinar la concentración de vanadio, arsénico y cromo en aguas de río¹⁷⁰. En las condiciones óptimas se alcanzó un límite de detección para vanadio de $0,1 \text{ }\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$. También se ha empleado esta técnica para llevar a cabo la especiación de

¹⁶⁷ Chakrapani, G.; Murty, D.S.R.; Mohanta, P.L.; Rangaswamy, R. Sorption of PAR-metal complexes on activated carbon as a rapid preconcentration method for the determination of Cu, Co, Cd, Cr, Ni, Pb and V in ground water. *J. Geochem. Expl.*, 63, 145, 1998.

¹⁶⁸ Román, D.A.; Rivera, L.; Morales, T.; Ávila, J; Cortés, P. Determination of trace elements in environmental and biological samples using improved sample introduction in flame atomic spectrometry (HHPN-AAS; HHPN-FF-AAS). *Intern. J. Environ. Anal. Chem.*, 83(4), 327, 2003.

¹⁶⁹ Thomaidis, N.S.; Piperaki, E.A. Comparison of chemical modifiers for the determination of vanadium in water and oil samples by electrothermal atomization atomic absorption spectrometry. *Analyst*, 121, 111, 1996.

¹⁷⁰ Pettine, M.; Mastroianni, D.; Camusso, M.; Guzzi, L.; Martinotti, W. Distribution of As, Cr and V species in the Po-Adriatic mixing area, (Italy). *Mar. Chem.*, 58, 335, 1997.

CAPÍTULO 1

vanadio en muestras de agua de lago, como se recoge en los trabajos realizados por Zhao y col.¹⁷¹. Los autores utilizaban Azul de Metileno para obtener el complejo de vanadio(V) que posteriormente quedaba retenido en una resina de intercambio iónico en medio ácido (pH 3). Posteriormente se eluía con NaOH 1 mol·L⁻¹ y se analizaba empleando nitrato de magnesio (Mg(NO₃)₂) como modificador de matriz. La concentración de vanadio(IV) se obtenía por diferencia entre la concentración de vanadio total y la de vanadio(V). En las condiciones óptimas, obtuvieron un límite de detección de 0,48 µg·L⁻¹ para vanadio(V) y un factor de preconcentración de 50.

Los trabajos realizados mediante la *espectroscopia de emisión en plasma* también han estado encaminados hacia el desarrollo de sistemas de separación y preconcentración del analito. Así, Wuilloud y col. emplearon el acoplamiento FIA-ICP para desarrollar un método de preconcentración *on-line* que permitiera determinar el contenido de vanadio en agua potable¹⁷². El proceso consistía en la formación de un complejo con 5-Br-PADAP, el cual se recogía sobre una columna rellena con Amberlita XAD-7, situada en el bucle de muestra, donde se producía la preconcentración. Tras la elución del analito con ácido nítrico, éste se determinaba por ICP. El límite de detección así como el factor de preconcentración que obtuvieron fueron de 40 ng·L⁻¹ y 75, respectivamente. Moyano y col. también han empleado el acoplamiento FIA-ICP para la preconcentración *on-line* y posterior determinación de vanadio en muestras acuosas (río y potable)¹⁷³. Los autores empleaban una minicolumna empaquetada con células de levadura (*Saccharomyces cerevisiae*) situada en la válvula de inyección por la que se hacía pasar la muestra a pH 7 para preconcentrar vanadio. Posteriormente el analito se eluía con una disolución de ácido nítrico (50% v/v) y se analizaba directamente en el plasma. En las condiciones óptimas, obtuvieron una frecuencia de análisis de 33 muestras a la hora con un factor de preconcentración de 45 y un límite de detección de

¹⁷¹ Zhao, L.; Zhu, X.; Feng, K.; Wang, B. Speciation analysis of inorganic vanadium (V(IV)/V(V)) by graphite furnace atomic absorption spectrometry following ion-exchange separation. Intern. J. Environ. Anal. Chem., 86 (12), 931, 2006.

¹⁷² Wuilloud, R.G.; Salonia, J.A.; Gásquez, J.A.; Olsina, R.A.; Martínez, L.D. On-line pre-concentration system for vanadium determination in drinking water using flow injection-inductively coupled plasma atomic emission spectrometry. Anal. Chim. Acta, 420, 73, 2000.

¹⁷³ Moyano, S.; Polla, G.; Smichowski, P.; Gásquez, J.A.; Martínez, L.D. On-line preconcentration and determination of vanadium in tap and river water samples by flow injection-inductively coupled plasma-optical emission spectrometry (FI-ICP-OES). J. Anal. At. Spectrom., 21, 422, 2006.

45 ng·L⁻¹. En el caso del análisis de muestras de agua de mar, al inconveniente de los bajos niveles de concentración del analito se une los efectos provocados por la matriz de la muestra. Además, cuando se emplea la técnica ICP-MS para la determinación de vanadio en agua de mar, otro factor importante que afecta a las medidas es la presencia de los iones cloruro, ya que la especie ClO⁺ presenta la misma relación masa/carga que vanadio (51). Por tanto, para obtener resultados adecuados es preciso eliminar las interferencias producidas por esta especie poliatómica. En este sentido, Wann y Jiang desarrollaron un método para determinar V(IV) y V(V) por ICP-MS sin las interferencias del ión cloruro, tras su previa separación por cromatografía líquida en fase reversa¹⁷⁴. En las condiciones óptimas, obtuvieron límites de detección de 25 ng·L⁻¹ y 41 ng·L⁻¹ para V(IV) y V(V), respectivamente. Un límite de detección de 0,1 ng·L⁻¹ para V(V) se indica en los trabajos realizados por Rahmi y col. para la determinación multielemental de metales traza en agua de mar mediante ICP-MS¹⁷⁵. Antes de la medida, se pasan 50 mL de la muestra a través de una minicolumna de Chelex 100 donde quedan retenidos los metales. Éstos son posteriormente eluidos con 0,5 mL de una disolución de ácido nítrico 2 mol·L⁻¹ que contiene además la disolución del patrón interno empleado para corregir los efectos de matriz (100 µg·L⁻¹ de Ge, In, Re y Tl). Esta disolución finalmente se analiza mediante ICP-MS, por lo que se alcanza un factor de preconcentración de 100.

Para concluir, mencionaremos otros trabajos realizados para determinar vanadio empleando otras técnicas instrumentales diferentes a las ya mencionadas. Así, Linstedt y Kruger emplearon el análisis por activación neutrónica para determinar vanadio en muestras acuosas naturales¹⁷⁶. Se ha utilizado también la espectrometría de fluorescencia de rayos X, como en los trabajos realizados por Gordeeva y col. para

¹⁷⁴ Wann, C.; Jiang, S. Determination of vanadium species in water samples by liquid chromatography-inductively coupled plasma mass spectrometry. *Anal. Chim. Acta*, 357, 211, 1997.

¹⁷⁵ Rahmi, D.; Zhu, Y.; Fujimori, E.; Umemura, T.; Haraguchi, H. Multielement determination of trace metals in seawater by ICP-MS with aid of down-sized chelating resin-packed minicolumn for preconcentration. *Talanta*, 72, 600, 2007.

¹⁷⁶ Linstedt, K.D.; Kruger, P. Determination of vanadium in natural waters by neutron activation analysis. *Anal. Chem.*, 42 (1), 113, 1970.

CAPÍTULO 1

determinar la concentración de vanadio y otros elementos metálicos en aguas naturales y extractos de suelos¹⁷⁷.

4. SEPARACIÓN DE METALES. MEMBRANAS LÍQUIDAS

Como ya se ha mencionado anteriormente, debido a los bajos niveles de concentración en los que suelen encontrarse cobre, cinc y vanadio en las muestras acuosas naturales, además de los problemas de interferencias que aparecen a medida que la complejidad de la muestra aumenta (como el agua de mar), en la mayoría de las ocasiones ha sido necesario realizar un paso previo de separación y/o preconcentración del analito antes de su medida. En este sentido, técnicas como la extracción líquido-líquido o el intercambio iónico se han empleado ampliamente para separar las especies de interés en una matriz más simple y posteriormente cuantificarlas mediante la técnica analítica más adecuada. Por otro lado, aparte de sus conocidas ventajas, estas técnicas de separación presentan una serie de inconvenientes, entre los cuales podemos destacar:

1. Elevada manipulación de muestras y reactivos, lo que aumenta la posibilidad de contaminación.
2. Utilización de volúmenes elevados tanto de muestras como de reactivos, que incrementa la necesidad de eliminar y disponer de mayor volumen de residuos.
3. Tiempos de operación, a veces, excesivamente largos, superiores incluso a las 24 h.
4. Empleo a veces de reactivos potencialmente tóxicos para el medioambiente.

Una nueva alternativa que está experimentando un fuerte desarrollo en los últimos años, y que permite minimizar los inconvenientes mencionados anteriormente, ha sido el empleo de las membranas líquidas. Éstas nos permiten realizar el proceso de extracción líquido-líquido y la posterior re-extracción del analito de forma simultánea. Comenzaremos describiendo brevemente el funcionamiento de los sistemas de preconcentración basados en el uso de membranas líquidas, así como los distintos tipos

¹⁷⁷ Gordeeva, V.P.; Statkus, M.A.; Tsysin, G.I.; Zolotov, Y.A. X-ray fluorescence determination of As, Bi, Co, Cu, Fe, Ni, Pb, Se, V and Zn in natural water and soil extracts after preconcentration of their pyrrolidinedithiocarbamates on cellulose filters. *Talanta*, 61, 315, 2003.

de membranas existentes para concluir con las variables que influyen en el transporte de las especies a través de ellas.

4.1. Sistemas de Membrana Líquida

Una membrana es, en general, una barrera semipermeable entre dos fases que permite el paso a través de ella de diversos compuestos, más o menos selectivamente. A este respecto, es importante señalar que, en general, una membrana se define y estudia en base a la función que tiene y no al material que se usa para su fabricación. En el caso de las membranas líquidas, esta barrera está constituida por una fase líquida que separa dos disoluciones inmiscibles con ella, y a través de la cual se produce el transporte de alguna especie química^{8,9}. La disolución donde se encuentra inicialmente la especie que se quiere transportar se denomina “*disolución cargada*”, y la disolución de destino se denomina “*disolución receptora*”. El caso más habitual es aquél en el que la membrana líquida está formada por una disolución orgánica, mientras que las disoluciones cargada y receptora son sendas fases acuosas.

El transporte de especies a través de una membrana líquida puede llevarse a cabo por dos tipos de mecanismos, que a su vez se pueden subdividir como se muestra de forma esquemática en la figura 1.1¹⁷⁸. A continuación se describirán cada uno de ellos:

1. Transporte Simple: la membrana líquida es simplemente un disolvente orgánico. A su vez, podemos distinguir entre:

- a. *Permeación Simple:* el soluto, P, pasa a través de la membrana como consecuencia de su solubilidad en ella. El transporte se detiene cuando se alcanza una concentración de equilibrio entre las dos fases.
- b. *Permeación con reacción química en la disolución receptora:* el transporte se ve favorecido como consecuencia de la presencia de un reactivo apropiado en la disolución receptora. De este modo aumenta la capacidad y selectividad del transporte, especialmente si el producto formado en la disolución receptora, PH^+ , es insoluble en la membrana líquida.

¹⁷⁸ Schlosser, S. COMETT. *Advanced Course on Membrane Technology, Module 4*. Arcavacata di Rende (Italy), 1993.

CAPÍTULO 1

2. **Transporte Asistido:** en este mecanismo, la disolución orgánica empleada como membrana lleva además disuelto un agente extractante que actúa como transportador de las especies que se desean transferir desde la disolución acuosa cargada hasta la receptora. Dentro de este tipo podemos distinguir los siguientes:

- c. *Transporte Facilitado:* aunque puede producirse la permeación simple del soluto, éste también reacciona reversiblemente con el agente extractante, lo cual permite acelerar el transporte.
- d. *Contratransporte Acoplado:* la especie de interés reacciona con el extractante, EH, formando un complejo que difunde a través de la membrana hasta contactar con la disolución receptora, donde se produce la reacción inversa. Para ello es necesario que en la disolución receptora exista una especie química que reaccione con el complejo liberando la especie de interés.
- e. *Cotransporte Acoplado:* en este caso se produce el transporte de la especie de interés junto con otra especie química presente en la disolución cargada, necesaria para mantener la neutralidad de los complejos formados en la disolución orgánica.
- f. *Transporte Primario Activo:* se facilita además mediante reacciones redox en la superficie de la membrana.

El empleo de agentes transportadores en las membranas líquidas presenta varias ventajas, entre las que destacan⁸:

- La posibilidad de alcanzar mayores flujos de materia.
- Realizar separaciones de gran selectividad. Esta propiedad del transportador permite obtener mejores separaciones frente a aquellas basadas sólo en la solubilidad y difusión de la especie química de interés.
- Los iones pueden concentrarse, ya que el transporte acoplado permite el paso de iones en contra de su gradiente de concentración.
- Pueden usarse extractantes de alto coste o de difícil obtención, ya que se utilizan volúmenes muy pequeños.

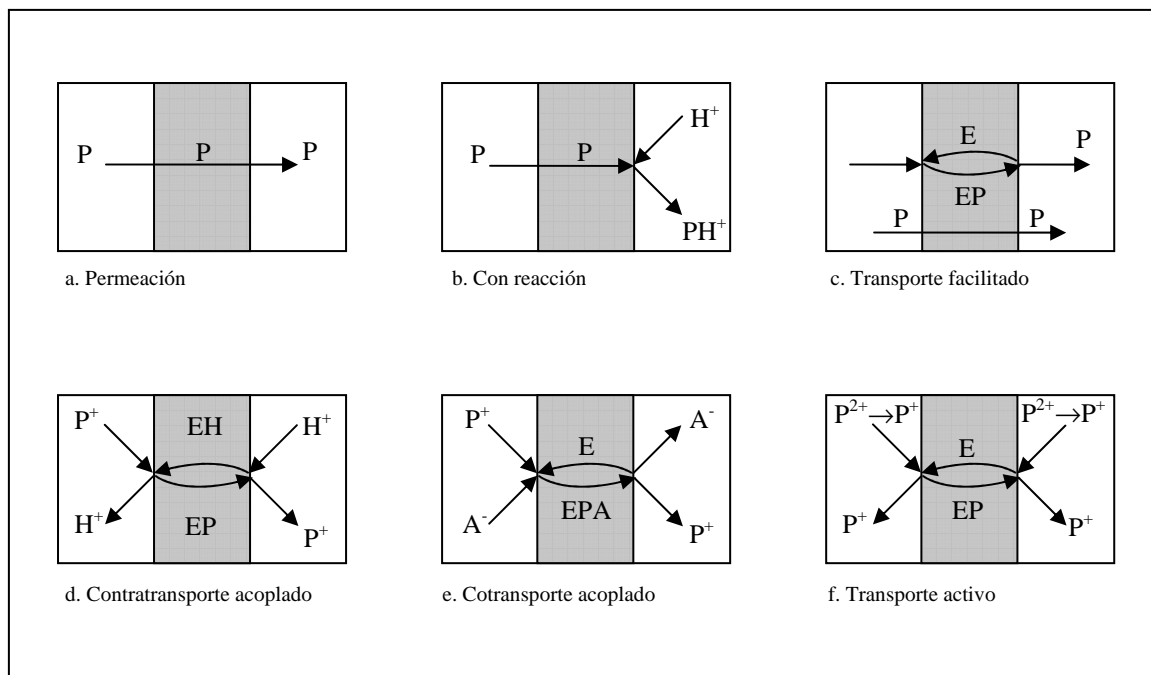


Figura 1.1. Mecanismos de transporte en membranas líquidas.

Es por ello que la mayoría de los trabajos propuestos en la bibliografía con membranas líquidas usan el transporte facilitado. Por otra parte, este tipo de mecanismo implica llevar a cabo un estudio exhaustivo sobre el funcionamiento químico del sistema, que permita establecer cuáles son las variables de las que depende el transporte para conseguir que éste sea óptimo. Entre éstas se puede citar el tipo de extractante utilizado, el disolvente en el que se encuentra y su concentración, la composición de las fases cargada y receptora, etc.

4.1.1. Tipos de membranas líquidas. Éstas pueden utilizarse en diferentes configuraciones, clasificándose en función de la forma física en que se emplee en tres grandes grupos: membranas líquidas de volumen (MLV), membranas líquidas soportadas (MLS) y membranas líquidas de emulsión (MLE)¹⁷⁹. A continuación se describirán brevemente cada una de ellas.

¹⁷⁹ Bartsch, R.A.; Way, J.D. *Chemical separations with liquid membranes: an overview*. ACS Symposium Series, 1996.

CAPÍTULO 1

1. Membranas líquidas de volumen. En este tipo de membranas se utiliza un volumen relativamente grande de fase orgánica (B) que separa la disolución cargada (A) y la receptora (C), estableciendo el contacto entre ellas. Se han utilizado distintas configuraciones de celdas para construir este tipo de membranas, alguna de las cuales se muestran en la figura 1.2, existiendo alternativas para disolventes orgánicos de mayor densidad que el agua (I y II) o de menor (III).

La principal ventaja de este tipo de configuración es que se trata de sistemas muy simples, aunque debido a la relativamente pequeña superficie de contacto de la membrana, la velocidad de transporte de la especie de interés es relativamente baja. Esta configuración se emplea mucho en el estudio de los mecanismos de transporte y el establecimiento de las condiciones químicas que permitan un transporte óptimo en términos de eficiencia y selectividad.

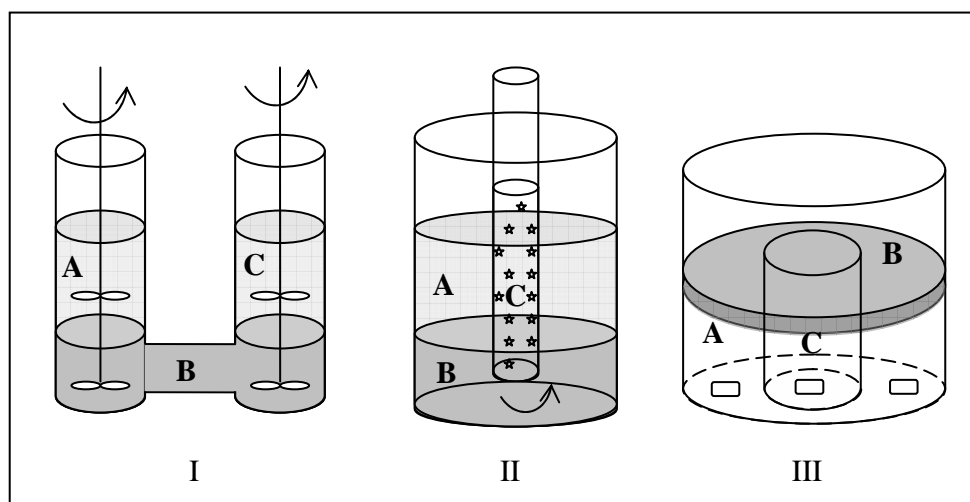


Figura 1.2. Distintos tipos de celdas utilizadas para membranas líquidas de volumen.

Así, Di Casa y col. sintetizaron dos tetra-aminas lipofílicas para utilizarlas como agentes transportadores de iones metálicos (Ni, Cu y Zn) a través de membranas líquidas¹⁸⁰. Concluyeron que el ión metálico que se extraía en mayor proporción era cobre, estando el proceso controlado por el pH y el tipo de anión inorgánico al que estaba unido. En otras ocasiones, el transporte del analito está

¹⁸⁰ Di Casa, M.; Fabbri, L.; Perotti, A.; Poggi, A.; Riscassi, R. Ligand field effects on the transport of 3d metal ions across a bulk liquid membrane by lipophilic tetraamine carriers. *Inorg. Chem.*, 25, 3984, 1986.

controlado por la difusión del complejo formado entre éste y el agente transportador, como se recoge en los trabajos realizados por Yang y Fane¹⁸¹. Estos autores aplicaron LIX 984N disuelto en queroseno como agente transportador de cobre y estudiaron la influencia de la velocidad de agitación y de la concentración de extractante en la eficacia del transporte. Concluyeron que agitando a 300 r.p.m. y con una concentración de LIX 984N al 20% en queroseno se alcanzaba la máxima eficacia.

Dimitrov y col. han indicado que el transporte de cinc desde un medio ácido clorurado estaba controlado por la difusión del complejo que formaba con el transportador, tri-n-octilamina disuelto en octano¹⁸². Los autores emplearon una modificación de las membranas líquidas de volumen, el dispositivo de película rotatoria, como se muestra en la figura 1.3. Éste estaba formado por cuatro compartimentos, separados de dos en dos, en su parte inferior, donde se alojaban las disoluciones acuosas cargada y receptora, respectivamente. Por encima de éstas se colocaba la disolución orgánica que actuaba como membrana y que unía ambas disoluciones acuosas. Para conseguir la agitación de las tres fases se utilizaban discos rotatorios verticales que se introducían en las disoluciones acuosas así como en la orgánica. Además, en éstos se formaban películas delgadas en su superficie que al entrar en contacto con la membrana daban lugar al transporte de cinc.

¹⁸¹ Yang, X.J.; Fane, A.G. Facilitated transport of copper in bulk liquid membranes containing LIX 984N. Sep. Sci. Tech., 34(9), 1873, 1999.

¹⁸² Dimitrov, K.; Alexandrova, S.; Saboni, A.; Debray, E.; Boyadzhiev, L. Recovery of zinc from chloride media by batch pertraction in a rotating film contactor. J. Membrane Sci., 207, 119, 2002.

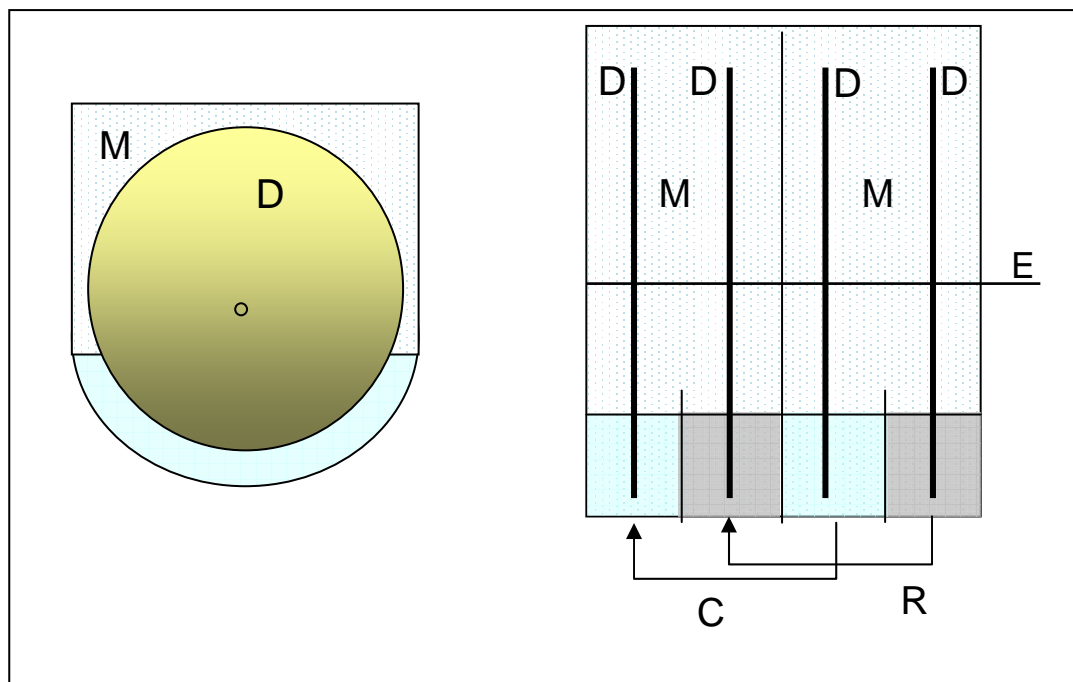


Figura 1.3. Esquema de un dispositivo de película rotatoria. C: Disolución cargada; R: Disolución receptora; M: Membrana líquida; D: Discos rotatorios; E: Eje.

En otras ocasiones, se han buscado extractantes selectivos para un determinado elemento. Así, para el transporte selectivo de cobre podemos citar, a modo de ejemplo, la N,N-diocetilglicilglicina disuelta en cloroformo¹⁸³, el tributilfosfato (TBP) para el caso de cinc¹⁸⁴ o el ácido N-fenil-(1,2-metanofullereno)61-formohidroxámico disuelto en cloroformo para vanadio¹⁸⁵.

Hasta el momento todos los trabajos mencionados estaban basados en el estudio de las condiciones más favorables para que tuviera lugar el transporte del analito de interés, pero en ninguno de ellos se realizaban medidas sobre muestras reales. No obstante, en los últimos años han comenzado a aparecer diferentes trabajos de aguas naturales en los que aplican los sistemas de membranas líquidas de

¹⁸³ Cleij, M.C.; Scrimin, P.; Tecilla, P.; Tonellato, U. Efficient and highly selective copper(II) transport across a bulk liquid chloroform membrane mediated by lipophilic dipeptides. *J. Org. Chem.*, 62, 5592, 1997.

¹⁸⁴ Miesiac, I.; Szymanowski, J. Separation of zinc(II) from hydrochloric acid solutions in a double Lewis cell. *Sol. Ext. Ion Exch.*, 22(2), 243, 2004.

¹⁸⁵ Agrawal, Y.K. A novel fullerene hydroxamic acid for the liquid-liquid extraction, separation, preconcentration, and spectrophotometric and ICP-AES determination of vanadium. *Fullerenes, nanotubes, and carbon nanostructures*, 11(2), 135, 2003.

volumen para la determinación de analitos en muestras reales. Éste es el caso de los trabajos realizados por Mendiguchía y col. para determinar cobre en muestras de agua de mar¹⁸⁶. Los autores emplearon una membrana líquida de volumen conteniendo DEHPA disuelto en queroseno como agente transportador para separar y preconcentrar el analito y espectroscopia de absorción atómica de llama para su cuantificación. En las condiciones óptimas alcanzaron un factor de preconcentración del 87% después de tres horas. Estos mismos autores se sirvieron del método simplex modificado para optimizar las variables que influían en el transporte de cobre¹⁸⁷. En las condiciones óptimas alcanzaron un factor de preconcentración para cobre de 4,30 después de 9 horas, lo que les permitía determinar concentraciones de analito al nivel de ppb en muestras de agua de mar mediante FAAS. También se ha determinado cadmio en agua de mar mediante FAAS tras su preconcentración en un sistema de membrana líquida de volumen¹⁸⁸. Los autores empleaban DEHPA disuelto en queroseno como agente transportador y adicionaban previamente ácido cítrico a las muestras para formar los complejos de calcio y magnesio y eliminar así sus efectos. En las condiciones optimizadas obtuvieron que el 100% del cadmio presente en las muestras era transportado a través de la membrana después de 10-11 horas. En los trabajos realizados por Granado-Castro y col. se obtuvo un factor de preconcentración para cobre más elevado (17,87), para un sistema de membrana líquida de volumen empleando como transportador el reactivo 2-acetilpiridina benzoílhidrazona (2-APBH) disuelto en tolueno¹⁸⁹. Tras la optimización de las variables que afectaban al comportamiento del sistema de preconcentración, obtuvieron que el analito podía determinarse en muestras naturales mediante FAAS después de 8 horas de agitación. Este compuesto orgánico también se ha empleado

¹⁸⁶ Mendiguchía, C.; Moreno, C.; García, M. Separation of heavy metals in seawater by liquid membranes: preconcentration of copper. *Sep. Sci. Technol.*, 37(10), 2337, 2002.

¹⁸⁷ Mendiguchía, C.; Moreno, C.; García, M. Determination of copper in seawater based on a liquid membrane preconcentration system. *Anal. Chim. Acta*, 460, 35, 2002.

¹⁸⁸ Irigoyen, L.; Moreno, C.; Mendiguchía, C.; García, M. Application of liquid membranes to sample preconcentration for the spectrometric determination of cadmium in seawater. *J. Membr. Sci.*, 274, 169, 2006.

¹⁸⁹ Granado, M.D.; Galindo, M.D.; García, M. Model experiments to test the use of a liquid membrane for separation and preconcentration of copper from natural water. *Anal. Chim. Acta*, 506(1), 81, 2004.

CAPÍTULO 1

para separar y preconcentrar cadmio en agua de mar¹⁹⁰. En las condiciones óptimas, los autores lograron un límite de detección para el analito de $6 \text{ ng}\cdot\text{L}^{-1}$. Un límite de detección de $15 \text{ ng}\cdot\text{L}^{-1}$ se ha obtenido en la separación y concentración de níquel en agua de mar empleando un sistema de membrana líquida de volumen¹⁹¹. Los autores también empleaban 2-APBH como agente transportador, concluyendo que tras 9-13 horas, dependiendo del contenido salino de la matriz de la muestra, se alcanzaba el máximo rendimiento del sistema.

2. Membranas líquidas soportadas. Este tipo de membranas, representadas esquemáticamente en la figura 1.4, consisten principalmente en una lámina o en un capilar de un material polimérico microporoso, cuyos poros se impregnan con una disolución orgánica que es la que actúa como membrana líquida permitiendo el transporte de la especie de interés una vez colocada entre las dos fases acuosas.

Este tipo de sistemas posee la ventaja de utilizar una membrana líquida muy fina, lo que acelera el transporte y permite la utilización de muy poca cantidad de disolvente orgánico. Sin embargo, el contacto con las fases acuosas puede causar pérdidas de la fase orgánica del interior de los poros, pudiendo llegar a perderse por completo, entrando así en contacto las dos disoluciones acuosas. Debido a ello resulta conveniente que tanto disolvente como transportador presenten alta hidrofobicidad. Otro de los méritos que presentan las membranas líquidas soportadas es su relativa facilidad para ser acopladas a sistemas automáticos. Uno de los principales inconvenientes que presentan, consiste en las bajas tasas de transporte global que se obtienen derivados de su inestabilidad, como consecuencia de la pérdida de la fase orgánica de los poros.

¹⁹⁰ Granado, M.D.; Galindo, M.D.; García, M. Separation and preconcentration of cadmium ions in natural water using a liquid membrane system with 2-acetylpyridine benzoylhydrazine as carrier by flame atomic absorption spectrometry. *Spectrochim. Acta Part B*, 59, 577, 2004.

¹⁹¹ Domínguez, F.C.; Galindo, M.D.; Díaz, I.C.; García, M.; Granado, M.D. Applicability of a liquid membrane in enrichment and determination of nickel traces from natural waters. *Anal. Bioanal. Chem.*, 389, 653, 2007.

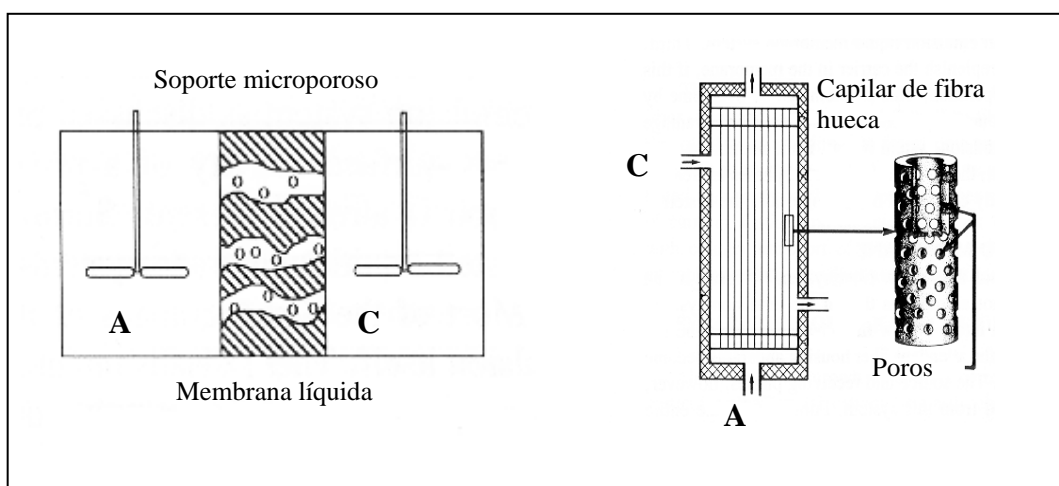


Figura 1.4. Esquema de una membrana líquida soportada con geometría laminar y capilar de fibra hueca. Disolución cargada (A); Disolución receptora (C).

Para minimizar estas pérdidas se han propuesto diversos dispositivos, como la utilización de sistemas de dos haces de capilares de fibra hueca, en la disposición en que se representa en la figura 1.5, en los que el disolvente además de hallarse en los poros de la membrana se encuentra en un volumen mayor, en el que se sumergen estos sistemas de capilares, garantizando así la presencia de fase orgánica en el interior de los poros.

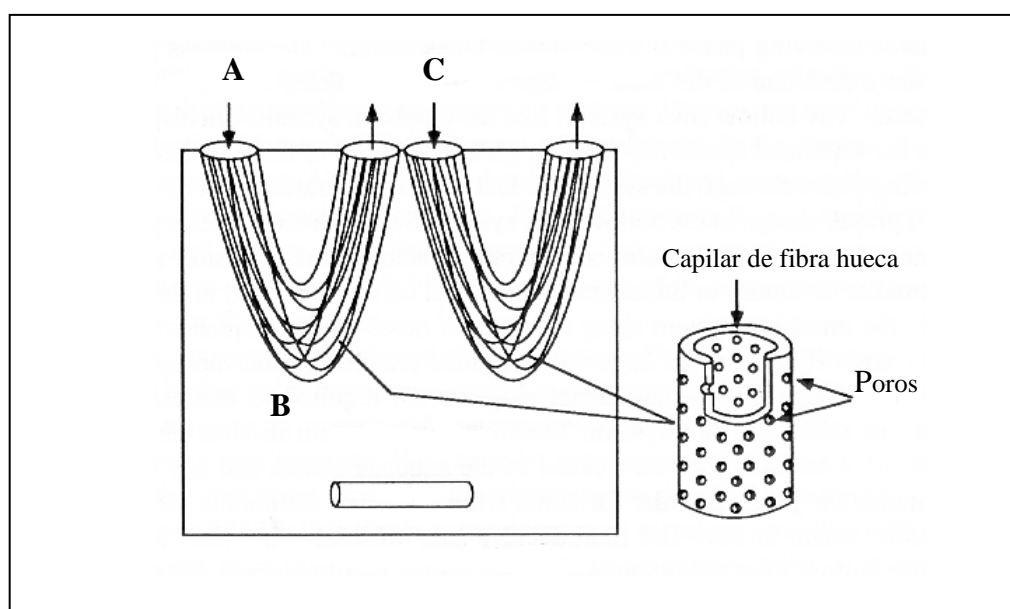


Figura 1.5. Esquema de membrana líquida con dos haces de capilares de fibra hueca.

CAPÍTULO 1

Como puede observarse en la figura, por el interior de cada haz de capilares, circula una de las dos disoluciones acuosas. Este tipo de membranas mejora la estabilidad y evita que se produzcan pérdidas del disolvente, permitiendo la manipulación de la membrana líquida durante los experimentos. Como contrapartida, el mayor volumen de fase orgánica produce una menor velocidad de transporte.

Otra configuración de membrana líquida soportada es la empleada por Belkhouche y col. para la recuperación selectiva de algunos iones metálicos mediante el empleo de derivados organofosforados como transportadores¹⁹². En la figura 1.6 se muestra dicho dispositivo y, como puede observarse, éste está formado por dos bloques circulares cuyas caras internas suelen estar construídas con politetrafluoroetileno y en las que se han practicado unos surcos en forma de espiral al objeto de que puedan circular por su interior las disoluciones acuosas. La membrana se sitúa entre ambos bloques y el conjunto se cierra herméticamente con tornillos. Las disoluciones acuosas cargada y receptora se introducen en el interior del sistema mediante bombas peristálticas, fluyendo en contracorriente la una respecto de la otra, y permaneciendo en todo momento en contacto con la membrana. De este modo, la disolución receptora se enriquece progresivamente con el analito de interés.

¹⁹² Belkhouche, N.E.; Didi, M.A.; Romero, R.; Jönsson, J.A.; Villemin, D. Study of new organophosphorus derivatives carriers on the selective recovery of M(II) and M(III) metals, using supported liquid membrane extraction. *J. Membr. Sci.*, 284, 398, 2006.

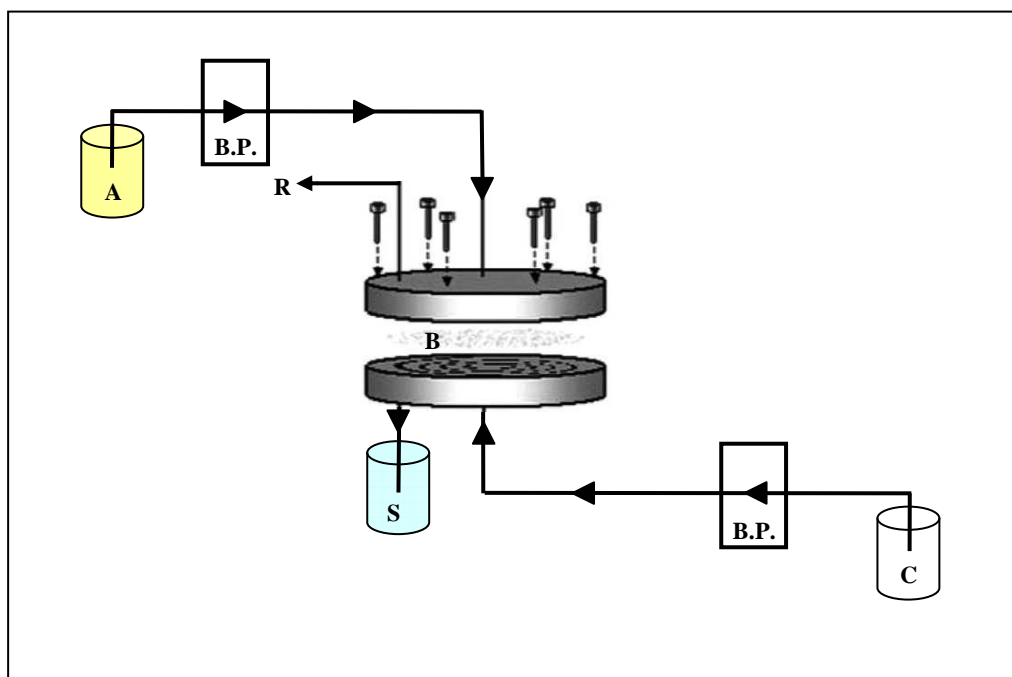


Figura 1.6. Sistema de membrana líquida soportada espiral. A: Muestra. B: Membrana. C: Disolución receptora. S: Disolución receptora enriquecida. R: Residuos. B.P.: Bomba peristáltica.

En otras ocasiones, se han buscado alternativas a los soportes sólidos empleados habitualmente. En este sentido, se han desarrollado y empleado las membranas de polímero de inclusión (MPI). De manera general, las MPI suelen obtenerse empleando una matriz polimérica, triacetato de celulosa (CTA) o cloruro de polivinilo (PVC), sobre la que se adiciona el extractante así como un agente plastificante para obtener una capa delgada y estable que actúa como membrana. Así, Tasaki y col. han empleado una MPI para el transporte y extracción selectiva de cobre en disoluciones acuosas¹⁹³. Para obtener la membrana, los autores emplearon CTA como polímero base, octil nitrofenil éter (NPOE) como plastificante y el ácido N-6-(*t*-dodecilamido)-2-piridinocarboxílico como transportador. También Pospiech y Walkowiak han empleado una MPI para la separación de cobre, cobalto y níquel en disoluciones acuosas en medio clorhídrico¹⁹⁴. El polímero base era CTA, el

¹⁹³ Tasaki, T.; Oshima, T.; Baba, Y. Selective extraction and transport of copper(II) with new alkylated pyridinecarboxylic acid derivatives. *Talanta*, 73, 387, 2007.

¹⁹⁴ Pospiech, B.; Walkowiak, W. Separation of copper(II), cobalt(II) and nickel(II) from chloride solutions by polymer inclusion membranes. *Sep. Purif. Technol.*, 57, 461, 2007.

CAPÍTULO 1

agente plastificante o-nitrofenil pentil éter (ONPPE) y como transportador se empleaba tri-isooctilamina (TIOA).

Como en el caso anterior, la aplicación de estos sistemas para la separación y/o preconcentración de elementos traza en aguas naturales es hoy día escasa, ya que la mayoría de los trabajos se han desarrollado para estudiar los diferentes factores que afectan a su funcionamiento. No obstante, pueden mencionarse algunos trabajos encontrados en la bibliografía, como el realizado por Rosell y col. para determinar vanadio(V) en disoluciones de sedimentos marinos tras su preconcentración en una membrana líquida soportada de fibra hueca empleando cloruro de tricaprilmilmetilamonio (Aliquat 336) como transportador¹⁹⁵; el efectuado por Djane y col. para determinar cobre, cadmio y plomo en muestras fluviales después de realizar una extracción mediante una membrana líquida soportada utilizando como transportador el DEHPA¹⁹⁶; el propuesto por Ndung'u y col. para determinar cinc, cobre y cobalto en agua de río¹⁹⁷ o el desarrollado por Cukrowska y col. para la extracción y preconcentración de compuestos orgánicos de estaño en muestras acuosas medioambientales¹⁹⁸.

3. Membranas líquidas de emulsión. Este tipo de membranas se prepara emulsionando una fase líquida receptora en un líquido inmiscible, que constituye la membrana. Un esquema simplificado de este tipo de membranas se muestra en la figura 1.7. La emulsión puede ser estabilizada mediante la adición de un agente tensioactivo. Esta emulsión es agitada posteriormente en una disolución acuosa donde se encuentra la especie de interés. La transferencia de masas tiene lugar entre la fase acuosa externa y la fase acuosa interna a través de la fase orgánica.

¹⁹⁵ Rosell, A.; Palet, C.; Valiente, M. Selective separation and concentration of vanadium(V) by a chemical pumping hollow-fiber supported liquid membrane. *Anal. Chim. Acta*, 349, 171, 1997.

¹⁹⁶ Djane, N.; Ndung'u, K.; Malcus, F.; Johansson, G.; Mathiasson, L. Supported liquid membrane enrichment using an organophosphorous extractant for analytical trace metal determination in river waters. *Fresenius J. Anal. Chem.*, 358, 822, 1997.

¹⁹⁷ Ndung'u, K.; Djane, N.; Mathiasson, L. Determination of trace metal ions in river water by ion-pair chromatography after enrichment using supported liquid membrane. *J. Chromatogr. A*, 826, 103, 1998.

¹⁹⁸ Cukrowska, E.; Chimuka, L.; Nsengimana, H.; Kwaramba, V. Application of supported liquid membrane probe for extraction and preconcentration of organotin compounds from environmental water samples. *Anal. Chim. Acta*, 523, 141, 2004.

El mérito de este tipo de membranas consiste en la gran superficie que presentan y su escaso grosor, lo que implica tasas de transporte más altas. Al mismo tiempo la elevada relación de volúmenes entre las fases acuosas permite obtener un alto grado de concentración. El mayor problema que presentan se relaciona con su estabilidad así como con la necesidad de romper la emulsión para recuperar la fase receptora una vez que se ha completado el transporte.

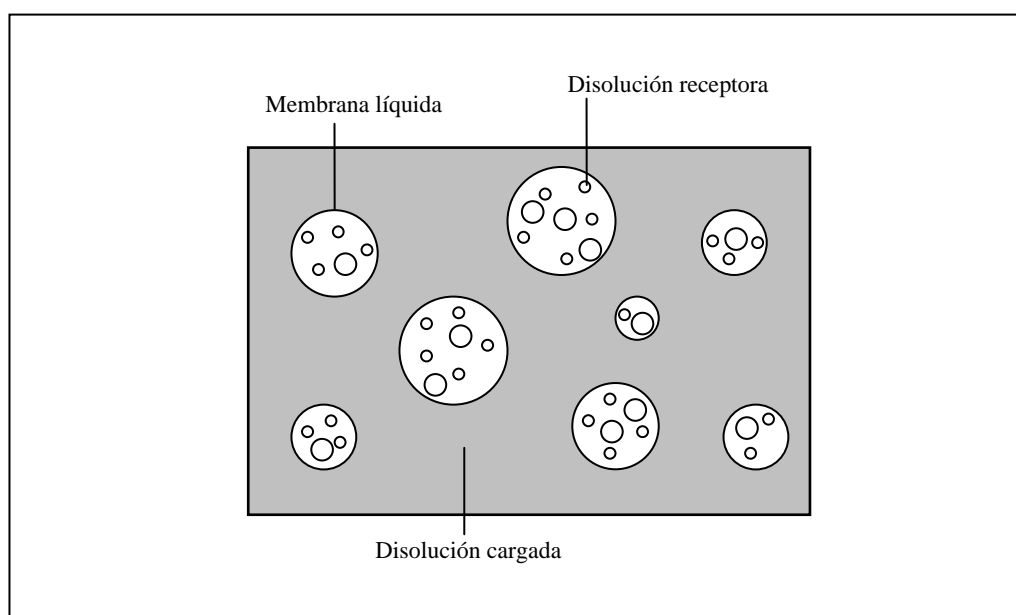


Figura 1.7. Esquema de membrana líquida de emulsión.

4.1.2. Variables que determinan el transporte. Como ya se ha comentado, es muy importante conocer los mecanismos de transporte a través de una membrana líquida para llevar a cabo su optimización, de modo que pueda obtenerse el máximo rendimiento del sistema. La mayor parte de los sistemas de separación basados en el uso de membranas líquidas precisan de una agitación o un flujo continuo de las dos disoluciones acuosas. A pesar de ello, siempre se conserva una fina capa inmóvil en la interfase entre las disoluciones acuosas y la orgánica, denominada capa de difusión, debido a que el transporte de masas en ella sólo puede ocurrir mediante procesos de difusión. Así pues, el transporte de un elemento a través de una membrana líquida va a

CAPÍTULO 1

depender tanto de ese paso de difusión como de la reacción química entre el compuesto a transportar y el agente transportador.¹⁹⁹ Dependiendo del sistema y del elemento transportado la etapa que limita el transporte puede ser uno u otro. Así, Zhang y Gozzelino han propugnado que el transporte de Fe(III) a través de una MLS formada por n-decanol y DEHPA está limitado por el paso de difusión del complejo Fe-DEHPA a través de la fase orgánica, mientras que para el Cu(II) el factor limitante es la reacción con el transportador en la interfase²⁰⁰. No obstante, Alguacil y Alonso han indicado que el transporte de Cu(II) a través de una MLS formada por Acorga M5640 disuelto en Iberfluid está limitado por la difusión del complejo a través de la fase orgánica²⁰¹. Esta misma conclusión se obtiene en los trabajos realizados por Molinari y col. para la recuperación selectiva de Cu(II) en aguas residuales empleando una MLS formada por 2-hidroxi-5-dodecilbenzaldehído disuelto en queroseno²⁰².

Por otro lado, el transporte a través de una membrana líquida depende del tipo de disolvente utilizado, de la naturaleza del analito que se quiere separar, de las características de las disoluciones que intervienen en el mecanismo y del agente transportador que se utilice, así como de las condiciones hidrodinámicas del sistema. Por esta razón es habitual encontrar multitud de trabajos enfocados al estudio de los mecanismos implicados en el transporte de distintas especies químicas a través de una membrana líquida. Este tipo de estudios son necesarios antes de intentar aplicar un determinado sistema a muestras reales. En este sentido, Gawronski y Religa proponen que el transporte de cromo(III) a través de una MLV con el ácido di-nonilnaftaleno sulfónico como transportador tiene lugar a partir de un cierto tiempo de retardo (0,5 h.), necesario para que se produzca la reorganización de las moléculas de transportador en la

¹⁹⁹ Peterson, R.T.; Lamb, J.D. *Design of macrocyclic carriers for liquid membranes*. ACS Symposium Series 642, ACS, Washington, 1996.

²⁰⁰ Zhang, B.; Gozzelino, G. Facilitated transport of Fe^{III} and Cu^{II} ions through supported liquid membranes. *Colloids and Surfaces A: Physicochem. Eng. Aspects* 215, 67, 2003.

²⁰¹ Alguacil, F.J.; Alonso, M. Description of transport mechanism during the elimination of copper(II) from wastewaters using supported liquid membranes and Acorga M5640 as carrier. *Environ. Sci. Technol.*, 39, 2389, 2005.

²⁰² Molinari, R.; Poerio, T.; Argurio, P. Selective removal of Cu²⁺ versus Ni²⁺, Zn²⁺ and Mn²⁺ by using a new carrier in a supported liquid membrane. *J. Membr. Sci.*, 280, 470, 2006.

membrana²⁰³. A partir de ese instante, el transporte del analito tiene lugar porque éste “salta” de una molécula complejante a otra en el interior de la membrana.

Además, hay que tener en cuenta que el transporte facilitado de un elemento a través de una membrana líquida precisa en muchos casos de la existencia de un contratransporte de otro elemento que permita regenerar el transportador. Son muchos los casos en los que este contratransporte es realizado por medio de iones H^+ , por lo que es necesaria la existencia de una diferencia de pH entre la disolución cargada y la receptora. Por esta razón muchos de los trabajos destinados a la optimización de los sistemas de membranas líquidas buscan cuál es la acidez óptima de ambas disoluciones acuosas, así como la necesidad de utilizar una disolución reguladora en la fase cargada para evitar un cambio de pH al recibir los H^+ que intervienen en el transporte. En este sentido, Gholivand y Korsandipoor han estudiado la influencia de la acidez de las dos disoluciones acuosas en el transporte de cobre a través de una membrana formada por cloroformo y un ácido carboxílico como transportador²⁰⁴. En este caso, los mejores resultados se alcanzaron a pH 8 en la fase cargada y 1,5 en la fase receptora. En los trabajos realizados por Rouhollahi y col. se indica que el transporte de cobre(II) a través de una MLV formada por cloroformo y una nueva base de Schiff tetradentada como transportador tiene lugar como consecuencia de un contratrasporte de protones²⁰⁵. Además, añadiendo un tensioactivo (dodecilsulfato sódico) a la disolución receptora conseguían un transporte muy selectivo del analito.

Puesto que cada sistema de membranas posee unas características propias, es preciso realizar un estudio exhaustivo de las variables que intervienen en el transporte en cada caso particular. Pero, no hay que olvidar que este tipo de trabajos deben considerarse como un paso previo en la aplicación analítica del sistema a muestras reales, ya que aún son numerosos los sistemas que no han demostrado su posibilidad real de aplicación.

²⁰³ Gawronski, R.; Religa, P. Transport mechanism of chromium(III) through the unmixed bulk liquid membrane containing dinonylnaphtalenesulfonic acid as a carrier. *J. Membr. Sci.*, 289, 187, 2007.

²⁰⁴ Gholivand, M.B.; Khorsandipoor, S. Selective and efficient uphill transport of Cu(II) through bulk liquid membrane using N-Ethyl-2-Aminocyclopentene-1-Dithiocarboxylic acid as carrier. *J. Membrane Sci.*, 180, 115, 2000.

²⁰⁵ Rouhollahi, A.; Zolfonoun, E.; Salavati-Niasari, M. Effect of anionic surfactant on transport of copper(II) through liquid membrane containing a new synthesis Schiff base. *Sep. Purif. Technol.*, 54, 28, 2007.

CAPÍTULO 1

**CAPÍTULO 2. DESARROLLO, OPTIMIZACIÓN Y VALIDACIÓN
DE NUEVOS MÉTODOS ANALÍTICOS DE ALTA
SENSIBILIDAD PARA LA DETERMINACIÓN DE METALES
(Cu, Zn, V) EN AGUAS NATURALES BASADOS EN
COMPLEJOS ORGÁNICOS**

CAPÍTULO 2

1. INTRODUCCIÓN

2. DESARROLLO EXPERIMENTAL

2.1. Ensayos Preliminares

2.2. Optimización de las condiciones de formación de los complejos

2.3. Validación del método

2.4. Aplicación a muestras reales

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1. NUEVA METODOLOGÍA ANALÍTICA PARA DETERMINACIÓN DE COBRE EN AGUAS NATURALES

3.1.1. Ensayos Preliminares

3.1.2. Optimización de las condiciones de formación del complejo metálico

3.1.3. Validación del método

3.1.4. Aplicación a muestras reales

3.2. DETERMINACIÓN DE TRAZAS DE CINC MEDIANTE LA FORMACIÓN DE UN QUELATO COLOREADO

3.2.1. Ensayos Preliminares

3.2.2. Optimización de las condiciones de formación del complejo metálico

3.2.3. Validación del método

3.2.4. Aplicación a muestras reales

3.3. MÉTODO SIMPLE Y EFECTIVO PARA LA DETERMINACIÓN DE VANADIO EN AGUAS NATURALES

3.3.1. Ensayos Preliminares

3.3.2. Optimización de las condiciones de formación de los complejos metálicos

3.3.3. Validación de los métodos

3.3.4. Aplicación a muestras reales

3.4. DETERMINACIÓN SIMULTÁNEA DE FORMAS QUÍMICAS DE VANADIO: ESPECIACIÓN DE V(IV) Y V(V)

3.4.1. Aditividad de las absorbancias de complejos de vanadio

3.4.2. Análisis de mezclas sintéticas

3.4.3. Estabilidad de los complejos

3.4.4. Verificación del método de especiación

CAPÍTULO 2

En este capítulo se describirán las distintas experiencias llevadas a cabo para desarrollar, optimizar y validar nuevos métodos para el control espectrofotométrico de cobre, cinc y vanadio utilizando quelatos metálicos formados con di-2-piridilcetona-benzoílhidrazona (dPKBH).

En primer lugar, se comenzará con la descripción de los parámetros estudiados para poner a punto el método de determinación en discontinuo para cobre, mostrando los resultados obtenidos tras su aplicación a diversos tipos de muestras. Dada la afinidad mostrada por el compuesto orgánico hacia cationes divalentes y, concretamente, su capacidad para formar un quelato con el catión Zn(II) cuya señal analítica es de magnitud similar a la obtenida con Cu(II), se intentó alcanzar las máximas prestaciones analíticas para ambos. En este sentido, se llevaron a cabo también diferentes experiencias para desarrollar un nuevo método en discontinuo de determinación espectrofotométrica de cinc utilizando el complejo metálico formado con el reactivo. Del mismo modo que en el caso anterior se muestran los resultados obtenidos tras su aplicación a diversos tipos de muestras acuosas.

Por último, se efectuaron una serie de experiencias encaminadas a la optimización de las variables que afectan a la formación de los complejos dPKBH-V(IV) y dPKBH-V(V) para su determinación espectrofotométrica. A partir de los resultados obtenidos, se comprobó la posibilidad de llevar a cabo estudios de especiación.

1. INTRODUCCIÓN

Como se ha mencionado en el capítulo anterior, tanto cobre como cinc y vanadio se encuentran entre los elementos que más extensamente se han estudiado, tanto desde el punto de vista medioambiental como industrial, biológico, etc. Esto ha provocado el desarrollo de un gran número de métodos analíticos para la determinación de sus contenidos en muestras de matrices muy diferentes.

Desde el punto de vista medioambiental, una de las características más deseables para estos métodos es la posibilidad de su aplicación *on-line* y/o *in situ*, ya que de esta forma se podrían mejorar la integridad y representatividad de las unidades ambientales y minimizar, entre otros, los errores de contaminación debidos a la manipulación de las muestras para su transporte y conservación. A este tenor, las ventajas que ofrecen los métodos espectrofotométricos, tales como la simplicidad instrumental, facilidad de manejo, respuesta rápida, bajo coste y elevada sensibilidad, los convierte en una elección apropiada.

Para la evaluación de estos analitos en muestras acuosas se han desarrollado una vasta cantidad de métodos espectrofotométricos, como ya se ha mencionado en el capítulo anterior, basados en la formación de un complejo coloreado mediante la reacción del ión metálico con distintos ligandos orgánicos quelatantes.

Entre los distintos compuestos orgánicos empleados como reactivos cromogénicos se encuentran los derivados de la hidrazona. Así, en el presente trabajo se seleccionó la di-2-piridilcetona benzoílhidrazona para la cuantificación espectrofotométrica directa de cobre, cinc y vanadio en muestras acuosas por medio de sus correspondientes quelatos metálicos.

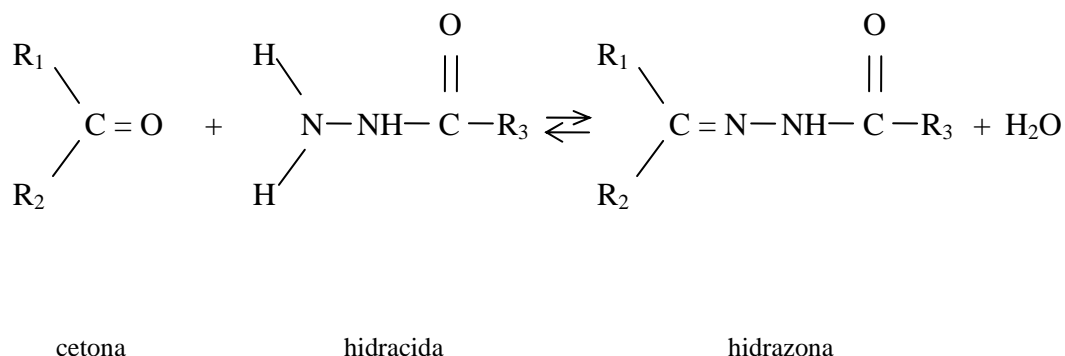
Características de la di-2-piridilcetona benzoílhidrazona

La dPKBH es un compuesto que pertenece a la familia de las hidrazonas y, más concretamente, al grupo de las aroílhidrazonas. Estos compuestos son derivados imínicos que poseen en su estructura la agrupación básica $>C = N - NH - CO -$.

En general, la síntesis de estos compuestos se realiza calentando suavemente cantidades equimoleculares de la hidracida y la cetona correspondientes. El producto formado se obtiene por precipitación del mismo durante la reacción o durante el

CAPÍTULO 2

enfriamiento de la disolución. A continuación, éste se recrystaliza en un disolvente adecuado. La reacción general que tiene lugar para la obtención de la hidrazona es la que se muestra:



Para la síntesis de la dPKBH se siguió el procedimiento descrito por García-Vargas y col.²⁰⁶ como se detalla a continuación:

Se pesan cantidades equimoleculares de di-2-piridilcetona y benzoílhidrácida en relación molar 1:2 y se disuelven en etanol. A continuación se mezclan ambas disoluciones en un matraz de fondo redondo, adicionando unas gotas de ácido clorhídrico concentrado, y se deja a reflujo durante una hora. Después de enfriar la disolución, se añade agua bidestilada hasta una relación en volumen 1:3 ($v_{org}:v_{ac}$) y unas gotas de una disolución 1N de hidróxido sódico, y se deja cristalizar en el frigorífico durante unas horas. Por último, se filtra la disolución y el precipitado obtenido se disuelve en etanol y posteriormente se precipita con agua bidestilada. El producto final se seca en estufa a una temperatura inferior a 50 °C durante unos minutos.

Características físico-químicas. De acuerdo con García-Vargas y col.²⁰⁶, el espectro de infrarrojos del reactivo presenta dos bandas débiles a 3.050 cm⁻¹ y 2.990 cm⁻¹ indicativas de la vibración del grupo = CH. Las bandas de amida están presentes como

²⁰⁶ García-Vargas, M.; Belizón, M.; Hernández-Artiga, M.P.; Martínez, C; Pérez-Bustamante, J.A. Ligands with the 'ONNN' group as chelating and preconcentrating substances of heavy metal ions: aroylhydrazone derivatives from di-2 pyridyl ketone. Appl. Spectrosc. 40, 1058, 1986.

Desarrollo, optimización y validación de nuevos métodos analíticos

una banda muy fuerte a 1.685 cm^{-1} y otras dos de intensidad media a 1.585 cm^{-1} y 1.560 cm^{-1} (amida I); la agrupación amida II muestra una banda fuerte a 1.525 cm^{-1} y otra media a 1.465 cm^{-1} . Por último, la tensión fuera del plano del grupo - OH (amida III) muestra dos bandas de intensidad media a 1.260 cm^{-1} y 745 cm^{-1} , respectivamente, y una fuerte a 690 cm^{-1} . La banda correspondiente a la vibración de alargamiento del grupo - NH no aparece en la región entre $3.100 - 3.500\text{ cm}^{-1}$ posiblemente como consecuencia de la existencia de un enlace de H intramolecular fuerte.

Del espectro ultravioleta del reactivo, se observa que éste sufre un efecto batocrómico cuando disminuye la polaridad del disolvente. En este sentido, una disolución acuosa del reactivo presenta dos bandas de absorción, una a 305 nm con un valor de absortividad molar de $16,0 \cdot 10^3\text{ L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$, y otra a 270 nm , para la que $\epsilon = 13,3 \cdot 10^3\text{ L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$. En dimetilformamida (DMF) las dos bandas se desplazan hasta 320 nm ($\epsilon = 14,1 \cdot 10^3\text{ L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$) y 272 nm ($\epsilon = 12,9 \cdot 10^3\text{ L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$). Cuando el reactivo se disuelve en etanol, éstas aparecen a 320 nm ($\epsilon = 16,1 \cdot 10^3\text{ L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$) y 270 nm ($\epsilon = 14,3 \cdot 10^3\text{ L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$). Por último, una disolución del reactivo en cloroformo presenta estas bandas a 325 nm ($\epsilon = 15,1 \cdot 10^3\text{ L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$) y 280 nm ($\epsilon = 15,7 \cdot 10^3\text{ L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$).

El análisis elemental del compuesto conduce a los siguientes resultados: 70,9% C; 4,52% H y 18,71% N. Los valores calculados, de acuerdo con la fórmula empírica del compuesto ($\text{C}_{18}\text{H}_{14}\text{N}_4\text{O}$), 71,5% C; 4,66% H y 18,53% N, coinciden estrechamente con los obtenidos experimentalmente. En la figura 2.1 se muestra la fórmula desarrollada del producto.

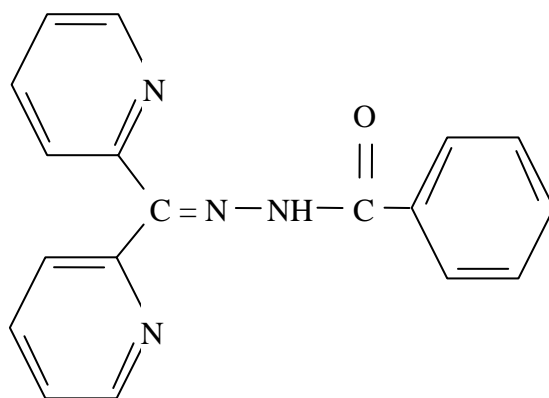


Figura 2.1. Estructura de di-2-piridilcetona benzoílhidrazona.

CAPÍTULO 2

Además de las características espectroscópicas, se comprobó la solubilidad del reactivo en distintos disolventes. En este sentido, se alcanzaron los siguientes resultados para el reactivo en agua, dimetilformamida, etanol, benceno y cloroformo: $0,2 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$, $87,6 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$, $15,2 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$, $15,6 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ y $50 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$, respectivamente²⁰⁶. Las disoluciones del reactivo en etanol, son estables al menos durante un mes.

Las constantes de disociación del reactivo se calcularon utilizando el método de Stenström-Goldsmith²⁰⁷. Los valores medios obtenidos fueron $2,57 \pm 0,05$ y $10,6 \pm 0,2$ para pK_1 y pK_2 , respectivamente²⁰⁶.

Por último, se estudió la reactividad del compuesto con distintos iones metálicos utilizando tres disoluciones reguladoras diferentes, cloroacetato ($\text{pH} = 3,0$), acetato ($\text{pH} = 4,7$) y borato ($\text{pH} = 8,6$), para cubrir un amplio intervalo de pH . Para formar los complejos correspondientes se adicionaban pequeños volúmenes de una disolución etanólica del reactivo a disoluciones acuosas que contenían el ión metálico, de tal forma que la relación volumétrica final agua:etanol era 10:3. Una vez formados, se registraba su espectro de absorción obteniéndose los resultados que se muestran en la tabla 2.1.

Como puede observarse, la mayoría de los metales estudiados forman complejos con el reactivo en medio acetato, apareciendo los máximos de absorción entre 365 nm y 405 nm. Además, los valores de absortividad molar son relativamente elevados. Por otra parte, a medida que aumenta la basicidad del medio se produce un aumento en los valores de absortividad molar, acompañado por un desplazamiento hipsocrómico de los máximos de absorción, para algunos complejos metálicos.

²⁰⁷ Stenström, W.; Goldsmith, N. Determination of the dissociation constants of phenol and the hydroxyl group of tyrosine by means of absorption measurements in the ultra-violet. *J. Phys. Chem.*, 30, 1683, 1926.

Desarrollo, optimización y validación de nuevos métodos analíticos

Tabla 2.1. Máximos de absorción y absortividades molares para los complejos M-dPKBH.

Ión metálico	Cloroacetato		Acetato		Borato	
	λ (nm)	ϵ (L·mol ⁻¹ ·cm ⁻¹)	λ (nm)	ϵ (L·mol ⁻¹ ·cm ⁻¹)	λ (nm)	ϵ (L·mol ⁻¹ ·cm ⁻¹)
Fe (II)	385	$0,2 \cdot 10^3$	365	$37,2 \cdot 10^3$	355	$5,4 \cdot 10^3$
Fe(III)	380	$3,9 \cdot 10^3$	365	$14,5 \cdot 10^3$	375	$8,0 \cdot 10^3$
Cu (II)	395	$17,4 \cdot 10^3$	385	$20,0 \cdot 10^3$	370	$71,8 \cdot 10^3$
Co (II)	410	$18,9 \cdot 10^3$	405	$34,6 \cdot 10^3$	370	$44,2 \cdot 10^3$
Ni (II)	385	$20,8 \cdot 10^3$	385	$46,4 \cdot 10^3$
Zn (II)	385	$14,1 \cdot 10^3$
Cd (II)	375	$9,4 \cdot 10^3$
Hg (II)	375	$24,6 \cdot 10^3$
Pb (II)	375	$1,3 \cdot 10^3$	415	$17,3 \cdot 10^3$
Bi (III)	390	$14,6 \cdot 10^3$	385	$16,3 \cdot 10^3$	375	$2,2 \cdot 10^3$
Au (III)	390	$0,8 \cdot 10^3$	370	$2,6 \cdot 10^3$	360	$5,6 \cdot 10^3$
Ga (III)	375	$25,1 \cdot 10^3$
V (V)	405	$8,9 \cdot 10^3$	400	$5,7 \cdot 10^3$
U (VI)	385	$30,7 \cdot 10^3$	390	$8,3 \cdot 10^3$

CAPÍTULO 2

2. DESARROLLO EXPERIMENTAL

La metodología empleada para el desarrollo, optimización y validación de cada uno de los métodos espectrofotométricos estudiados fue similar en todos los casos. En este sentido, a continuación se realizará una descripción general de cada una de las etapas seguidas para la optimización, validación y posterior aplicación de los procedimientos desarrollados.

2.1. Ensayos Preliminares

Para desarrollar el método de análisis con el reactivo cromogénico seleccionado, se comprobó inicialmente la correcta formación del complejo coloreado con el catión metálico (Cu(II), Zn(II) ó V(IV/V)) así como su posterior medición espectrofotométrica. Para ello, se utilizaron inicialmente las condiciones descritas por García-Vargas y col.²⁰⁶, preparándose varias disoluciones que contenían $1 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ del ión metálico a estudiar a las que se les añadió un exceso de reactivo y un 10% (v/v) de etanol. Posteriormente, se obtuvieron los espectros de absorción de los complejos formados frente a un blanco preparado con las mismas cantidades de dPKBH y etanol que en las muestras que contenían el analito.

2.2. Optimización de las condiciones de formación de los complejos

Una vez conocidas las longitudes de onda donde se producía la máxima absorbancia de cada complejo, y al objeto de conseguir la máxima sensibilidad para el método de determinación, se procedió a la optimización de las variables químicas que controlaban el comportamiento de cada sistema: pH del medio así como concentración de la disolución reguladora utilizada para su control, concentración de reactivo y concentración de etanol. Todos los ensayos se llevaron a cabo preparando disoluciones que contenían $1 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ del ión metálico en estudio bajo distintas condiciones, pero siempre en un volumen final de 10 mL al objeto de minimizar el consumo tanto de muestras como de reactivos, midiendo la absorbancia de los complejos formados frente a sus correspondientes blancos a la longitud de onda óptima para cada uno de ellos.

Desarrollo, optimización y validación de nuevos métodos analíticos

Una vez optimizadas las variables químicas que afectaban de modo directo a la formación de los complejos, se procedió al estudio de otras variables que también podían influir en el sistema. Dichas variables fueron el orden de adición de los reactivos y el lapso de tiempo de estabilidad del complejo formado. Una vez estudiadas ambas variables, se procedió a establecer la estequiometría de cada complejo utilizando tanto el método de Job o de las variaciones continuas como el método de la razón molar. Para llevarlos a cabo, se prepararon distintas disoluciones acuosas de ión metálico así como disoluciones acuo-etanólicas de reactivo cromogénico, y se mezclaron en las proporciones apropiadas para establecer la relación estequiométrica en las que reaccionaban dichas especies para dar lugar a la formación del complejo.

El método de Job consiste en preparar distintas muestras a partir de disoluciones de la misma concentración total de metal y reactivo en las que se varía la relación volumétrica entre ambos pero manteniendo constante el volumen total en cada una. A continuación, se miden frente a sus blancos correspondientes y se representa la absorbancia corregida frente a la fracción molar del catión. Se obtienen así dos líneas rectas cuyo punto de corte corresponde a la relación de combinación entre el catión y el ligando en el complejo formado.

En el método de la razón molar se preparan una serie de disoluciones en las que se mantiene constante la concentración de uno de los reactivos y se varía de modo creciente la relación molar entre ligando y metal. En este caso se mantuvo constante la concentración del ión metálico y se varió el número de moles de reactivo por cada mol de catión. Una vez preparadas las distintas disoluciones, éstas se midieron frente a sus blancos correspondientes y se representaron los valores de absorbancia corregidos frente a la razón molar entre reactivo e ión metálico. Igual que en el caso anterior, se obtienen dos líneas rectas cuyo punto de corte coincide con la relación molar entre reactivo y catión.

2.3. Validación del método

Una vez realizados los estudios precedentes, se procedió a la validación del método analítico desarrollado. Éste es un proceso mediante el cual se establece, por estudios de laboratorio, que las características representativas del mismo cumplen con

CAPÍTULO 2

las especificaciones para las que se propone su aplicación²⁰⁸. En este sentido, es necesario realizar previamente una descripción del sistema analítico, indicando el objetivo y tipo de método, el tipo e intervalo de concentración de analito(s) que se va a determinar, los tipos de materiales o matrices para los que el método se va a aplicar y el protocolo a seguir con dicho método²⁰⁹. Además, deben señalarse unos criterios para los parámetros de diseño del mismo que deben alcanzarse para resolver el problema analítico particular. Éstos dependerán fundamentalmente del objetivo y campo de aplicación del método, afectando directamente al estudio de validación que se realice. En general, se estudian los siguientes parámetros analíticos^{210, 211}: intervalo de linealidad, límites de detección y cuantificación, robustez, precisión, sesgo, exactitud y selectividad (presencia de interferencias).

En nuestro caso, los parámetros que se consideraron más importantes y, por tanto, se estudiaron para cada uno de los métodos desarrollados fueron los siguientes: linealidad, límites de detección y cuantificación, precisión, presencia de interferencias, sesgo y exactitud.

Linealidad

Para determinar el intervalo de concentración en el que es aplicable la ley de Beer, se prepararon distintas disoluciones acuosas del ión metálico en las que se variaba su concentración final y se mezclaban con las disoluciones de reactivo, etanol y reguladora. A partir de los datos que se obtuvieron en este estudio fue posible determinar la concentración de ión metálico más elevada para la cual la relación entre la señal analítica (absorbancia a la longitud de onda característica) y aquella seguía siendo lineal. A continuación, se calculó el valor de absortividad molar.

²⁰⁸ Eurachem Guide. The fitness for purpose of analytical methods. A laboratory guide to method validation and related topics. LGC, Teddington, Middlesex, UK, 1998. (<http://www.eurachem.bam.de>)

²⁰⁹ Taverniers, I.; De Loose, M.; Van Bockstaele, E. Trends in quality in the analytical laboratory. II. Analytical method validation and quality assurance. Trends Anal. Chem., 23, 8, 535, 2004.

²¹⁰ Chan, C.C. Cap. 2. Potency method validation en *Analytical method validation and instrument performance verification*. Ed. John Wiley & Sons. 2004

²¹¹ Feinberg, M. Validation of analytical methods based on accuracy profiles. J. Chromatogr. A, 1158, 174, 2007.

Desarrollo, optimización y validación de nuevos métodos analíticos

Límites de detección y cuantificación

Este parámetro también puede evaluarse a partir de la ecuación de la recta de regresión. Para ello, se obtuvieron distintas rectas de calibrado a partir de disoluciones cuyas concentraciones finales de analito eran cada vez más pequeñas, calculándose el límite de detección para cada una de ellas utilizando el criterio del cociente entre tres veces la desviación estándar del blanco y la pendiente de la recta de regresión. El límite de cuantificación se obtuvo calculando el cociente entre diez veces la desviación estándar del blanco y la pendiente de la recta de regresión.

Precisión

Para ésta se realizaron los estudios correspondientes para establecer tanto la repetibilidad (medidas intra-día) como la reproducibilidad (medidas inter-días). En este sentido, para obtener la repetibilidad, se prepararon once disoluciones acuosas que contenían $1 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ del ión metálico en estudio y se siguió el procedimiento puesto a punto. Una vez formado el complejo se medía la absorbancia de cada una de las disoluciones frente a su blanco correspondiente. A partir de los datos obtenidos se calcula la desviación estándar relativa. En el caso de la reproducibilidad, se recopilaban los datos obtenidos tras el análisis de disoluciones que contenían la misma concentración de ión metálico durante varios días y se calcula la desviación estándar relativa.

Estudio de Interferencias

Con el propósito de poder aplicar la metodología desarrollada a muestras reales, se procedió a la determinación de posibles interferencias causadas por la presencia en la disolución de diversas especies catiónicas y aniónicas. De este modo, se prepararon disoluciones de varios cationes en forma de cloruros, nitratos o sulfatos así como de diferentes aniones como sales de potasio, sodio o amonio. Para cuantificar la variación que se producía en la absorbancia de una disolución que contenía tan sólo el analito, se adicionaba el posible interferente y se realizaba la correspondiente lectura espectrofotométrica. Una determinada especie se consideró interferente cuando se producía una variación en la absorbancia de $\pm 5\%$ con respecto a la de la disolución que

CAPÍTULO 2

contenía tan sólo el analito.

Para realizar este estudio todas las disoluciones se prepararon en matraces de 10 mL, siguiendo el procedimiento descrito anteriormente, y con un contenido de $50 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ del analito en estudio. En primer lugar, se comenzó por el estudio de los aniones, continuando posteriormente con los cationes.

Una vez realizado el estudio de las interferencias, se procedió a la búsqueda de posibles agentes enmascarantes que permitieran la ampliación del campo de aplicación correcta de cada uno de los métodos desarrollados. Para ello, se seleccionaron en primer lugar los compuestos que podrían ofrecer mejores resultados y, a continuación, se emplearon en distintas concentraciones para comprobar su eficacia.

Exactitud

Esta suele estudiarse como la suma de dos componentes: sesgo y precisión. Para estudiar el sesgo se emplearon materiales de referencia certificados, los cuales se analizaron siguiendo el procedimiento optimizado. Las concentraciones de analito encontradas se compararon con los valores certificados y se expresaron como porcentajes de recuperación.

2.4. Aplicación a muestras reales

Una vez analizadas todas las variables que caracterizan a los nuevos métodos de determinación desarrollados, éstos carecen de interés práctico si no es posible aplicarlos a muestras reales con buenos resultados. En este sentido, tras comprobar la validez del método propuesto, éste se aplicó a muestras acuosas de diferente composición y se compararon los resultados con los obtenidos mediante otras técnicas analíticas tales como la espectroscopía de absorción atómica de llama (FAAS) o la espectroscopía de emisión de plasma acoplado inductivamente (ICP-OES).

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1. NUEVA METODOLOGÍA ANALÍTICA PARA DETERMINACIÓN DE COBRE EN AGUAS NATURALES

A continuación se muestran los resultados obtenidos para la determinación de cobre siguiendo el procedimiento descrito en el desarrollo experimental.

3.1.1. Ensayos Preliminares

En primer lugar se comprobó la formación del complejo coloreado entre el catión y el reactivo cromogénico. Para ello, inmediatamente después de mezclar las disoluciones de los reactivos se registró el espectro de absorción del complejo Cu(II)-dPKBH frente a un blanco del reactivo preparado añadiendo la misma cantidad de dPKBH en etanol que la disolución que contenía cobre. De los espectros se desprende que la máxima absorbancia del complejo aparece a 370 nm, por lo que en adelante, los diferentes estudios de optimización del sistema se llevaron a cabo a dicha longitud de onda.

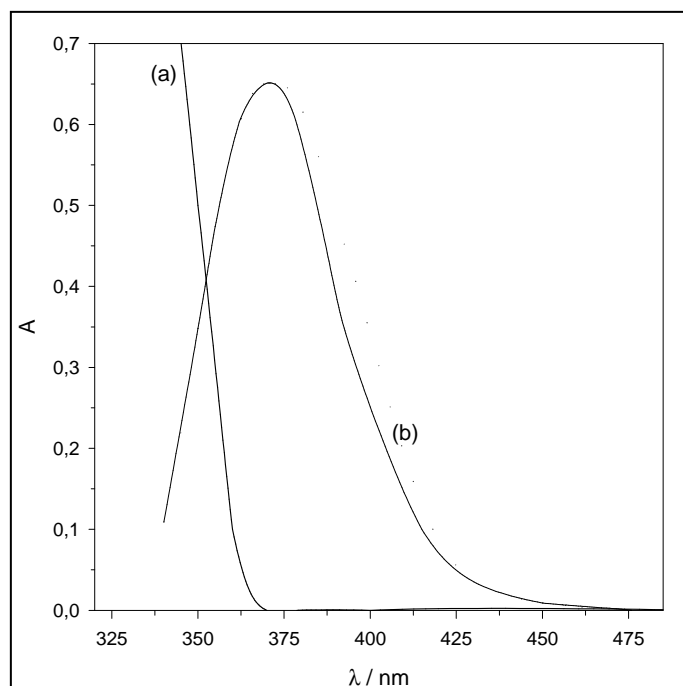


Figura 2.2. Espectro de absorción de (a) blanco del reactivo ($[dPKBH] = 3,25 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$; pH = 8; 10% etanol) y (b) complejo Cu(II)-dPKBH ($[Cu(II)] = 1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$; $[dPKBH] = 3,25 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$; pH = 8; 10% etanol).

CAPÍTULO 2

En la figura 2.2 se muestra el espectro de absorción del complejo Cu(II)-dPKBH frente a su blanco correspondiente.

3.1.2. Optimización de las condiciones de formación del complejo

Efecto del pH del medio

Para estudiar el efecto de esta variable en la absorbancia del complejo se prepararon distintas disoluciones en matraces de 10 mL que contenían $1 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de Cu(II), $3,25\cdot 10^{-4} \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ dPKBH y 10% de etanol. El pH de las mismas se varió entre 3 y 11 mediante la adición de pequeños volúmenes de ácido nítrico (HNO_3) o hidróxido sódico (NaOH) según fuese necesario. De manera similar, pero en ausencia de cobre, se prepararon los correspondientes blancos. A continuación, se realizó la medida de sus absorbancias a 370 nm, mostrándose los resultados en la figura 2.3. En ésta se puede observar cómo existe un intervalo de pH, comprendido entre 7 y 9, en el cual la formación del complejo tiene lugar en las condiciones más adecuadas, seleccionándose como valor de pH a utilizar 8.

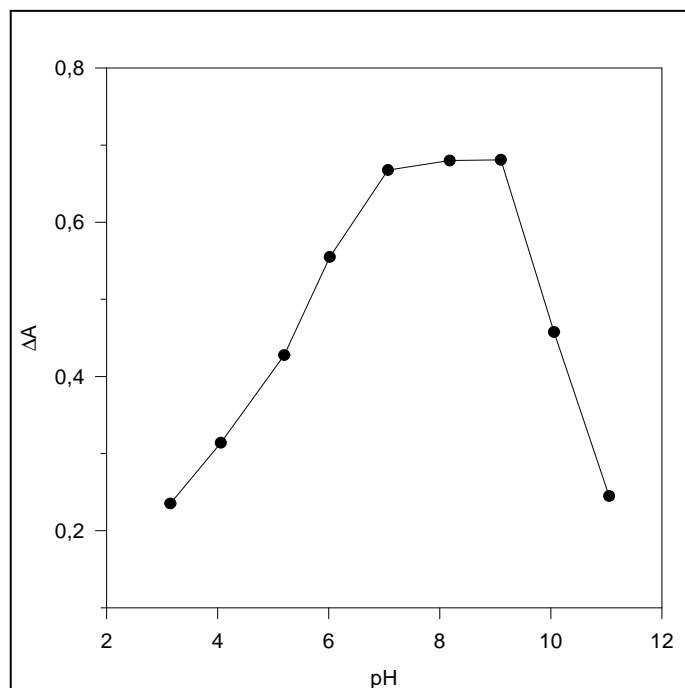


Figura 2.3. Efecto del pH sobre la absorbancia del complejo Cu(II)-dPKBH. $[\text{Cu(II)}] = 1 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$; $[\text{dPKBH}] = 3,25\cdot 10^{-4} \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$; 10% etanol. $\Delta A = A_{\text{complejo}} - A_{\text{blanco}}$.

Desarrollo, optimización y validación de nuevos métodos analíticos

Control del pH del medio

Dado que la formación del complejo tiene lugar en un intervalo de pH entre 7 y 9, se hace necesaria la elección de una disolución reguladora adecuada para mantener constante este valor en cada una de las disoluciones que vayan a medirse. Debido a ello, se seleccionó en primer lugar la disolución reguladora formada por el sistema del ácido fosfórico, que puede intercambiar hasta tres protones con valores de pK de 2,15 (pK₁), 7,20 (pK₂) y 12,74 (pK₃). Así, su utilización en el intervalo de pH 7-9 vendrá regido por el intercambio de un protón del anión H₂PO₄⁻. El siguiente paso consistió en determinar la concentración final de dicha disolución en el matraz para mantener el pH de la muestra en el valor deseado. Para ello, se prepararon distintas disoluciones en matraces de 10 mL que contenían 1 mg·L⁻¹ de Cu(II), 3,25·10⁻⁴ mol·L⁻¹ de reactivo y 10% de etanol, así como sus correspondientes blancos, y se varió la concentración final de la disolución reguladora en cada una entre 3,33·10⁻³ mol·L⁻¹ y 3,33·10⁻² mol·L⁻¹.

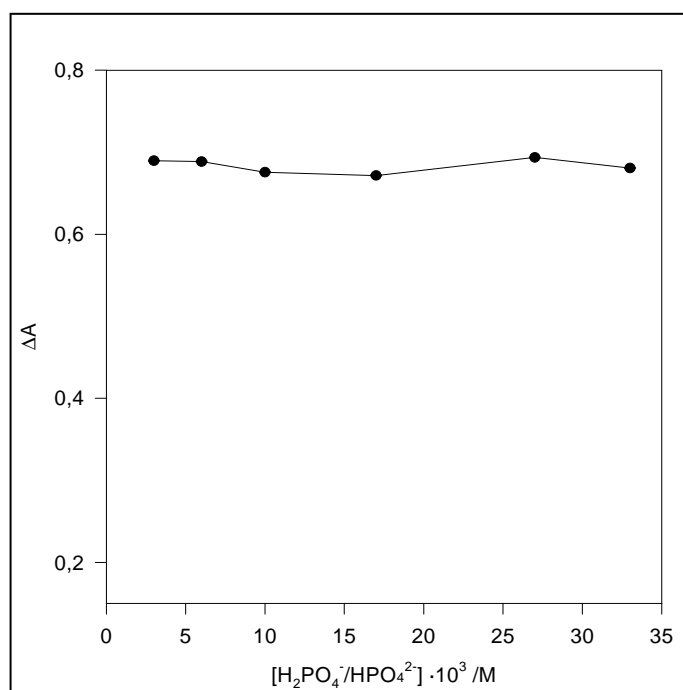


Figura 2.4. Efecto de la concentración de la disolución reguladora sobre la absorbancia del complejo Cu(II)-dPKBH. [Cu(II)] = 1 mg·L⁻¹; [dPKBH] = 3,25·10⁻⁴ mol·L⁻¹; 10% etanol. ΔA = A_{complejo} - A_{blanco}.

De las absorbancias obtenidas, que se muestran en la figura 2.4, se desprende

CAPÍTULO 2

que, en este caso, el aumento de la concentración de la disolución reguladora de pH no tiene prácticamente influencia sobre la absorbancia, siendo la concentración más diluída suficiente para mantener el pH adecuado. No obstante, se seleccionó como concentración óptima $1,65 \cdot 10^{-2} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ya que el aumento de la capacidad reguladora aumenta la robustez del método al asegurar la formación del complejo durante el análisis de muestras acidificadas.

Concentración óptima de dPKBH

Una vez seleccionadas las condiciones de acidez más adecuadas para la formación del complejo, se varió la concentración final del reactivo en la disolución entre $1,3 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ y $1,3 \cdot 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$. Para ello, se prepararon diversas disoluciones que contenían $1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ de Cu(II) en las condiciones de pH óptimo, así como sus correspondientes blancos, y se midieron espectrofotométricamente a 370 nm. En estas condiciones, el reactivo estaba en todo momento en exceso y los valores de absorbancia obtenidos para cada una de las muestras ensayadas mostraban que eran prácticamente independientes de la concentración de reactivo, como se observa en la figura 2.5.

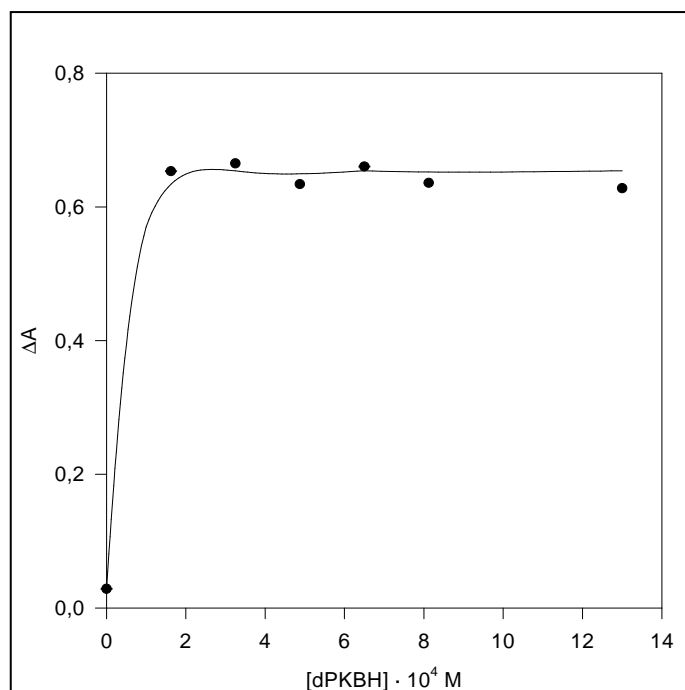


Figura 2.5. Efecto de la concentración de reactivo sobre la absorbancia del complejo Cu(II)-dPKBH. [Cu(II)] = $1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$; $[\text{H}_2\text{PO}_4^-/\text{HPO}_4^{2-}] = 1,65 \cdot 10^{-2} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$; 10% etanol. $\Delta A = A_{\text{complejo}} - A_{\text{blanco}}$.

Desarrollo, optimización y validación de nuevos métodos analíticos

De este modo, la concentración de reactivo elegida para la formación del complejo en experimentos posteriores fue de $3,25 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$.

Naturaleza acuoetanólica del medio

La presencia de etanol en la disolución se debe a la necesidad de mantener en disolución al reactivo, pero por otro lado, su porcentaje debe ser tal que asegure la ausencia de cualquier precipitado. Para estudiar los efectos de su concentración, se prepararon diversas disoluciones que contenían $1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ de Cu(II); $3,25 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ dPKBH y $1,65 \cdot 10^{-2} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ de tampón de fosfato, así como sus blancos correspondientes, y se varió el porcentaje final de etanol en las mismas en el intervalo comprendido entre 2,5-50 %. Como se puede observar en la figura 2.6, las medidas a 370 nm presentaban valores de absorbancia que eran prácticamente independientes del porcentaje final de etanol, aunque a valores superiores a 20% aumenta la incertidumbre de las medidas debido a la aparición de turbidez en las muestras.

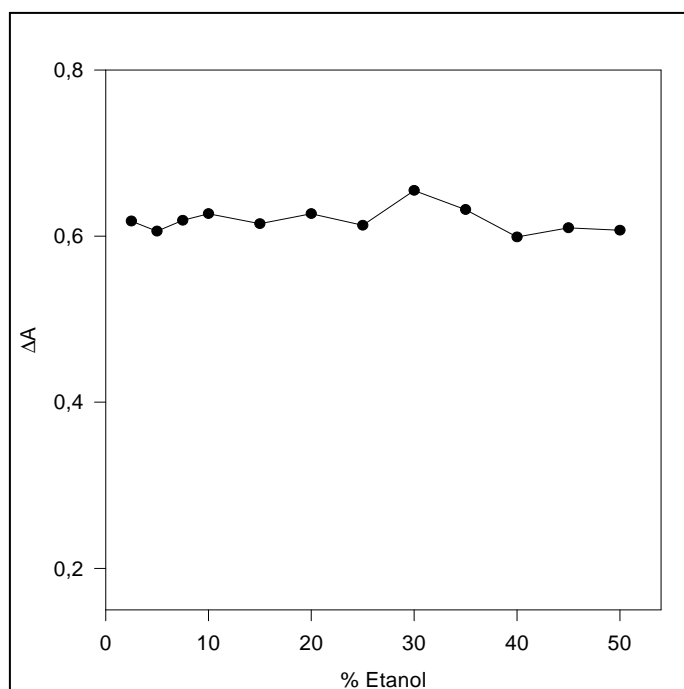


Figura 2.6. Influencia del porcentaje de etanol sobre la absorbancia del complejo Cu(II)-dPKBH. $[\text{Cu(II)}] = 1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$; $[\text{dPKBH}] = 3,25 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$; $[\text{H}_2\text{PO}_4^-/\text{HPO}_4^{2-}] = 1,65 \cdot 10^{-2} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$. $\Delta A = A_{\text{complejo}} - A_{\text{blanco}}$.

Por tanto, para obtener la formación del complejo en condiciones adecuadas y

CAPÍTULO 2

las medidas con mayor precisión se tomó un porcentaje de etanol de 10% como el más apropiado.

Orden de adición de los reactivos

Cuando se forma un complejo coloreado, además de las variables químicas que intervienen en el proceso, el orden de adición de los reactivos puede tener a veces un efecto importante en la reacción, tanto en sus aspectos termodinámicos como cinéticos. Teniendo esto en cuenta, se prepararon varias disoluciones y sus correspondientes blancos en las condiciones químicas anteriormente seleccionadas como óptimas, variando el orden de adición de los reactivos como se muestra en la tabla 2.2. Tanto las muestras como los correspondientes blancos se prepararon en matraces de 10 mL y se midieron espectrofotométricamente a 370 nm. Todas las muestras se prepararon con una concentración final de $1 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de Cu(II); $3,25\cdot 10^{-4} \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ dPKBH; $1,65\cdot 10^{-2} \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ tampón de fosfato y 10% etanol. Los blancos se prepararon del mismo modo excepto que no se les adicionaba el cobre. De los valores de absorbancia que se obtienen para cada una de las muestras ensayadas, se comprobó que eran relativamente independientes del orden de adición de los reactivos. No obstante, se alcanzan valores ligeramente superiores para el orden: Cu (II), tampón fosfato, dPKBH y etanol. Debido a esto, el orden elegido para la formación del complejo es el mencionado anteriormente.

Tabla 2.2. Absorbancia del complejo Cu-dPKBH para distintos órdenes de adición de reactivos.

Orden de adición	ΔA
Cu-tampón-dPKBH-etanol	$0,677\pm 0,001$
Cu-tampón-etanol-dPKBH	$0,635\pm 0,001$
Cu-etanol-dPKBH-tampón	$0,664\pm 0,001$
Cu-dPKBH-etanol-tampón	$0,654\pm 0,001$

Estequiometría del complejo

Una vez establecidas las condiciones químicas más adecuadas para la formación del complejo, se aplicaron dos métodos diferentes para establecer la estequiometría del mismo. En la figura 2.7 se muestran los resultados obtenidos cuando se llevan a cabo las experiencias para obtener la estequiometría del complejo mediante el método de Job. En

Desarrollo, optimización y validación de nuevos métodos analíticos

la misma se observa que en el punto de corte de ambas rectas la fracción molar para el cobre es $X_{\text{Cu(II)}} = 0,32$, lo que indica que para el dPKBH ésta valdrá 0,68. Estos resultados sugieren una relación molar Cu:dPKBH 1:2. Este resultado indica que probablemente el dPKBH actúa como un ligando bidentado.

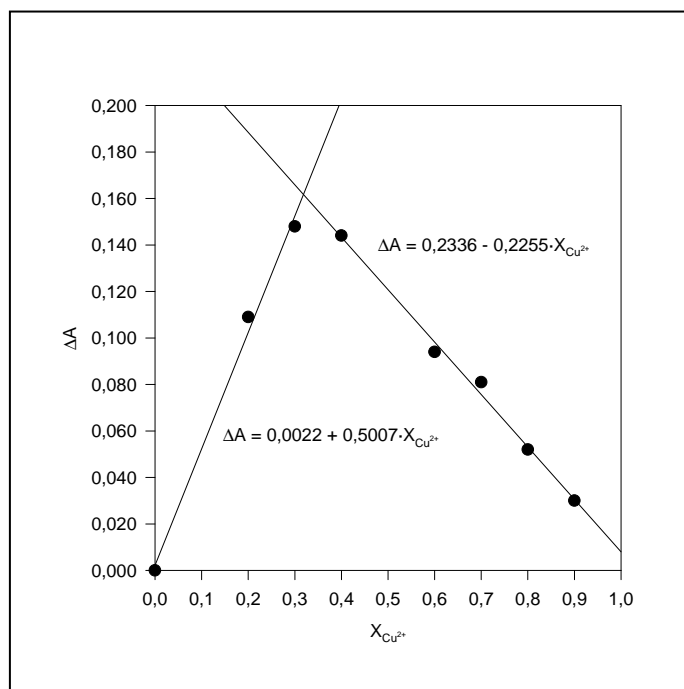


Figura 2.7. Estequiometría del complejo Cu(II)-dPKBH mediante el método de Job o de las Variaciones Continuas.

En el caso del método de la razón molar se mantuvo constante la concentración de cobre y se varió el número de moles de reactivo por cada mol de catión, como se muestra en la figura 2.8. Una vez preparadas, las disoluciones se midieron espectrofotométricamente a 370 nm frente a sus blancos correspondientes y se representaron los valores de absorbancia corregidos frente a la razón molar entre reactivo y cobre. Igual que en el caso anterior, se obtienen dos líneas rectas cuyo punto de corte coincide con la relación molar entre reactivo y catión. En esta ocasión éste vale 2,2, por lo que se puede afirmar que la relación molar dPKBH:Cu(II) es 2:1. Este resultado es coherente con el obtenido por el método anterior, por lo que se puede concluir que la relación estequiométrica Cu(II):dPKBH es 1:2.

CAPÍTULO 2

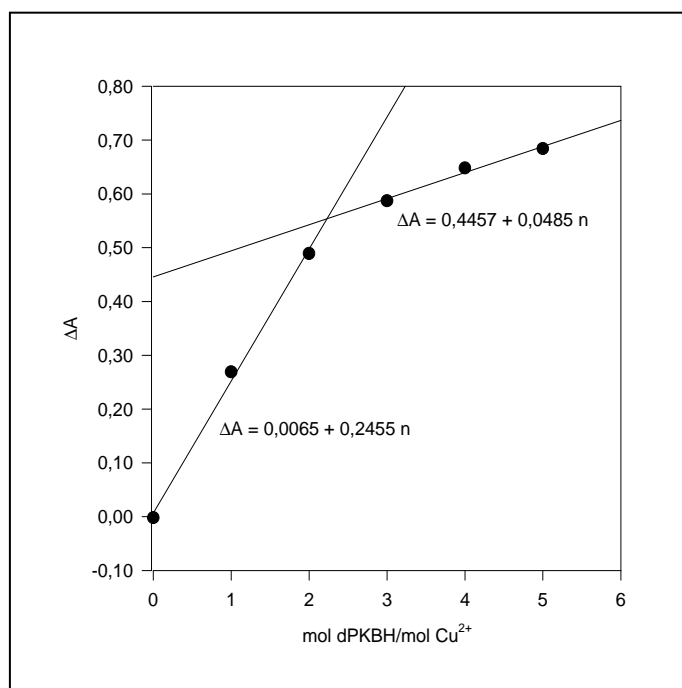


Figura 2.8. Estequiometría del complejo Cu(II)-dPKBH mediante el método de la Razón Molar.

De los resultados obtenidos se deduce que el ión metálico debe coordinarse con dos moléculas de reactivo para formar el complejo. Esto indica que el enlace formado por el átomo de cobre con cada molécula de reactivo surge como consecuencia de la desprotonación de cada grupo CONH dando lugar a la estructura que se propone en la figura 2.9 para el complejo formado en disolución:

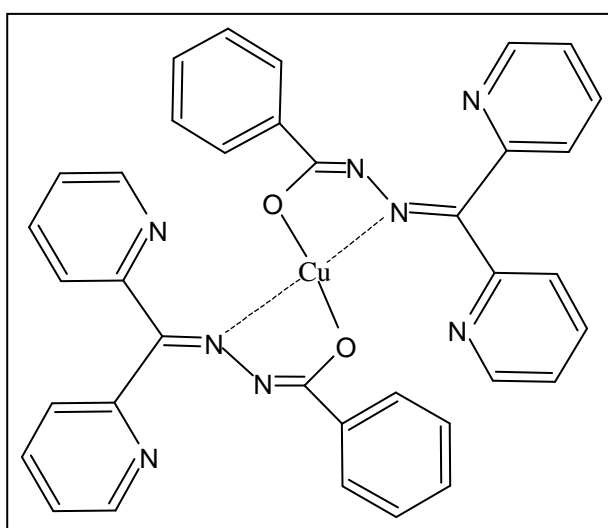


Figura 2.9. Estructura propuesta para el complejo Cu(II)-dPKBH.

Desarrollo, optimización y validación de nuevos métodos analíticos

Estabilidad del complejo

Una vez obtenidas las condiciones más adecuadas para la formación del complejo, se procedió al estudio de la estabilidad del mismo. Para ello, se realizaron medidas de la absorbancia en función del tiempo. En la figura 2.10 se muestran los resultados alcanzados, observándose que la absorbancia máxima se alcanza inmediatamente y permanece estable durante al menos 24 horas.

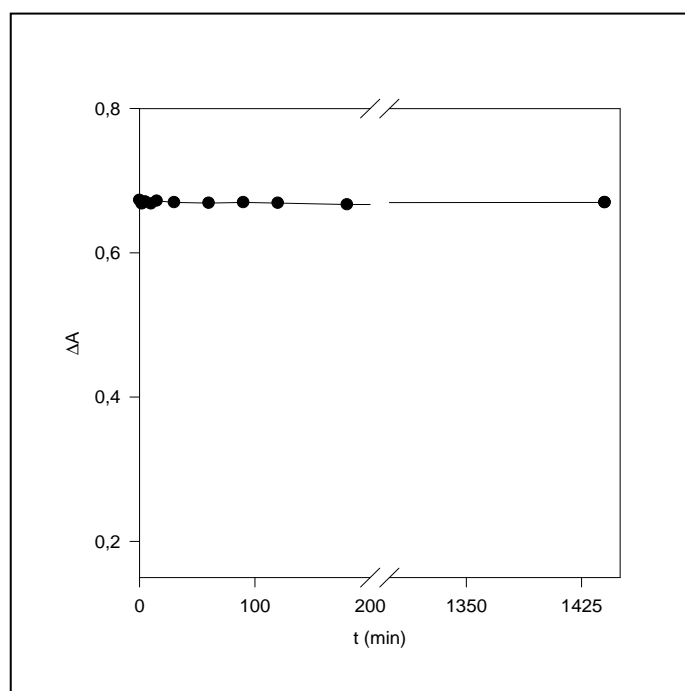


Figura 2.10. Estabilidad del complejo Cu(II)-dPKBH.
[Cu(II)] = 1 mg·L⁻¹; [dPKBH] = 3,25·10⁻⁴ mol·L⁻¹; [H₂PO₄⁻/HPO₄²⁻] = 1,65·10⁻² mol·L⁻¹; 10% etanol. ΔA = A_{complejo} - A_{blanco}

3.1.3. Validación del método

Una vez que se estudiaron y optimizaron todas las variables químicas que afectan al sistema analítico, se procedió al análisis de aquellas características analíticas que permiten evaluar la bondad de la nueva metodología desarrollada. A continuación se muestran los resultados obtenidos.

CAPÍTULO 2

Intervalo de linealidad

En la figura 2.11 se presentan los resultados obtenidos entre 0 y 5 mg·L⁻¹ de Cu(II), observándose un comportamiento lineal para la concentración de analito hasta 3 mg·L⁻¹. Para confirmar el resultado se calcula la diferencia entre el resultado experimental y el proporcionado por la recta de regresión. Así, para 3 mg·L⁻¹ Cu(II) se obtiene 0,43% mientras que es -11,3% para 4 mg·L⁻¹.

Utilizando los datos de la gráfica anterior en los que el comportamiento del sistema es lineal, se obtiene la siguiente ecuación de regresión:

$$A = 0,6169 (\pm 0,0060) [\text{Cu(II)}] + 0,0039 (\pm 0,0010) \quad r^2 = 0,9996$$

Teniendo en cuenta que todos los valores de absorbancia mostrados hasta el momento son el resultado de la media de al menos tres medidas repetidas, los intervalos de confianza para la pendiente y la ordenada en el origen para esta ecuación se calcularon como ts_a y ts_b , siendo s_a y s_b las desviaciones estándar relativas para la pendiente y la ordenada en el origen, respectivamente, y t es el parámetro de la distribución de Student para $n-2$ grados de libertad al 95% de confianza ($p = 0,05$).

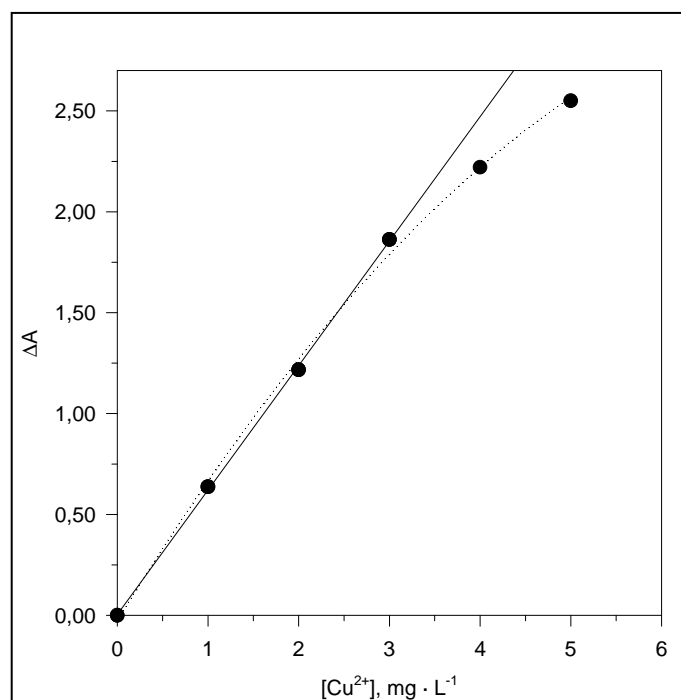


Figura 2.11. Intervalo de linealidad para Cu(II). [dPKBH] = $3,25 \cdot 10^{-4}$ mol·L⁻¹; $[\text{H}_2\text{PO}_4^-/\text{HPO}_4^{2-}] = 1,65 \cdot 10^{-2}$ mol·L⁻¹; 10% etanol. $\Delta A = A_{\text{complejo}} - A_{\text{blanco}}$.

Desarrollo, optimización y validación de nuevos métodos analíticos

Absortividad molar

La absortividad molar es una constante característica de cada compuesto absorbente y depende de la longitud de onda a la que se realicen las medidas. De acuerdo con la expresión matemática de la Ley de Beer ($A = \epsilon \cdot b \cdot c$), ésta es la constante de proporcionalidad entre la señal analítica (absorbancia) y la concentración del analito. En este sentido, las pendientes de las ecuaciones de las rectas de regresión obtenidas cuando se expresa la concentración de analito en $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, nos proporcionan información acerca del coeficiente de absortividad molar del método, ya que la longitud del camino óptico (b) es constante y las medidas se realizan utilizando cubetas de 1 cm de paso de luz.

Así, la absortividad molar del método obtenida es:

$$\epsilon = 3,92 \cdot 10^4 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$$

Límites de detección y cuantificación

Otro parámetro que puede determinarse a partir de la ecuación de la recta de regresión es el límite de detección del método. Para ello, se obtuvieron distintas rectas de calibrado a partir de disoluciones cuyas concentraciones finales de cobre eran cada vez más pequeñas. En la tabla 2.3 se muestran los parámetros de ajuste de las rectas de regresión para los diferentes intervalos de concentración estudiados. Cada recta se construyó con cinco puntos como mínimo, realizándose al menos tres medidas de cada uno de ellos. En la última columna de dicha tabla se muestran los límites de detección para cada intervalo, utilizándose el criterio del cociente entre tres veces la desviación estándar de la ordenada en el origen y la pendiente de la recta, para obtenerlos. De este modo, se puede observar que utilizando el intervalo de concentraciones más bajo, el límite de detección del método es:

$$\text{L.D.} = 2,5 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$$

El valor del límite de detección indica que el método desarrollado proporciona una sensibilidad del mismo orden de magnitud que algunos métodos atómicos y mejor

CAPÍTULO 2

que la mayoría de métodos espectrofotométricos ya descritos en la introducción de la presente memoria.

Tabla 2.3. Intervalos de concentración empleados para calcular el límite de detección.

Intervalo (mg·L ⁻¹)	Ordenada en el origen	Pendiente	r ²	^a s _a	^a s _b	L.D. (mg·L ⁻¹)
0 – 2	1,5·10 ⁻³	0,6507	0,9995	0,0084	0,0074	3,9·10 ⁻²
0 – 2	6,8·10 ⁻³	0,6130	0,9995	0,0074	0,0066	3,6·10 ⁻²
0 – 0,1	-7,0·10 ⁻⁴	0,6609	0,9976	8,2·10 ⁻⁴	0,0146	3,7·10 ⁻³
0 – 0,05	7,7·10 ⁻⁴	0,6430	0,9977	5,4·10 ⁻⁴	0,0177	2,5·10 ⁻³

^as_a y s_b son las desviaciones estándar de la ordenada en el origen y la pendiente, respectivamente.

De manera análoga, el límite de cuantificación (L.C.) del método, empleando el intervalo de concentraciones más bajo es:

$$\text{L.C.} = 8,4 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$$

Precisión

Para establecer la *repetibilidad* se prepararon once muestras que contenían 1 mg·L⁻¹ Cu(II) y los distintos reactivos en las condiciones óptimas y se midieron frente a su blanco correspondiente. En la figura 2.12 se muestran los resultados conseguidos, para los que:

$$\text{R.S.D.} = 0,46\%$$

A partir de este resultado podemos concluir que el método propuesto proporciona una adecuada repetibilidad en las medidas.

Para comprobar la *reproducibilidad* se recopilaron los resultados obtenidos tras el análisis de once disoluciones con el mismo contenido en cobre (1 mg·L⁻¹) medidas en once días. En esta ocasión:

$$\text{R.S.D.} = 2,24\%$$

Desarrollo, optimización y validación de nuevos métodos analíticos

Este valor nos permite destacar que el método propuesto también posee una buena reproducibilidad en las medidas.

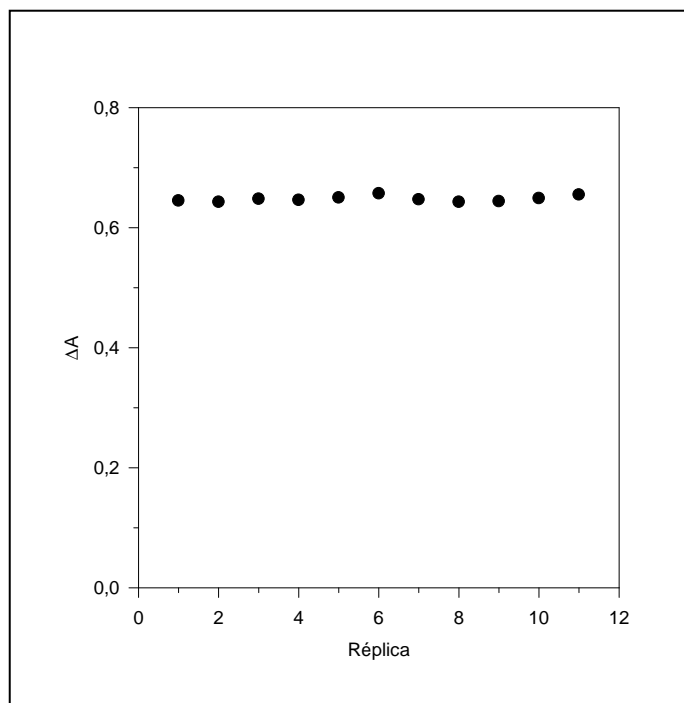


Figura 2.12. Valores de absorbancia obtenidos para once disoluciones conteniendo $1 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ Cu(II).

Estudio de Interferencias

Para este estudio se observó la variación que experimentaba la absorbancia de una muestra que contenía $50 \text{ }\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ de Cu(II) tras la adición del posible ión interferente. Todas las muestras y los blancos correspondientes se prepararon en matraces de 10 mL siguiendo el procedimiento descrito anteriormente.

Aniones

Se utilizaron sales sódicas, potásicas y amónicas en todos los casos en los que fue posible. En la tabla 2.4 se detallan las especies aniónicas que se estudiaron como posibles interferentes. En todos los casos, se prepararon disoluciones concentradas de cada anión, con una concentración de $0,16 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$. A partir de ellas, mediante dilución, se prepararon una serie de disoluciones conteniendo diferentes relaciones molares entre metal y especie interferente. En este caso, las relaciones molares estudiadas fueron las

CAPÍTULO 2

siguientes: 1:1.000; 1:5.000; 1:10.000 y 1:20.000.

En aquellos casos en los que se apreciaba interferencia a la relación molar de 1:1.000 se ensaya el límite de tolerancia para el anión interferente a ese nivel.

Tabla 2.4. Aniones y sales utilizadas para el estudio de interferencias.

Anión	Sales utilizadas	Anión	Sales utilizadas	Anión	Sales utilizadas
Cloruro	NaCl KCl NH ₄ Cl	Nitrato	NaNO ₃ KNO ₃ NH ₄ NO ₃	Sulfato	Na ₂ SO ₄ K ₂ SO ₄ (NH ₄) ₂ SO ₄
Bromuro	KBr	Nitrito	NaNO ₂	Oxalato	(NH ₄) ₂ C ₂ O ₄ · H ₂ O
Fluoruro	NH ₄ F	Perclorato	NaClO ₄	Tartrato	C ₄ H ₄ O ₇ KSb · ½ H ₂ O
Yoduro	KI	Acetato	NaCH ₃ COO NH ₄ CH ₃ COO	Citrato	Na ₃ Cit · 2 H ₂ O

A continuación se detallan los resultados obtenidos en cada caso:

Cloruros, Nitratos y Sulfatos. En la figura 2.13 se muestran las variaciones de absorbancia experimentadas por los complejos Cu(II)-dPKBH con distintas adiciones de estos aniones. Como puede observarse, la presencia del ión cloruro no produce alteración de la absorbancia medida, al menos entre valores de razón molar comprendidos entre 0 y 20.000. Este hecho se verificó además para todas las sales estudiadas. Este mismo efecto se observa, en general, para el caso de nitratos y sulfatos. No obstante, la adición de nitrato potásico a partir de una relación de 10.000 respecto de cobre, provoca una ligera desviación de la absorbancia media, probablemente como consecuencia de la presencia de impurezas de la sal utilizada y/o la aparición de turbidez por el aumento de la fuerza iónica. Un efecto similar, aunque de menor importancia, se observó tras la adición de sulfato de amonio para la relación molar más elevada.

Desarrollo, optimización y validación de nuevos métodos analíticos

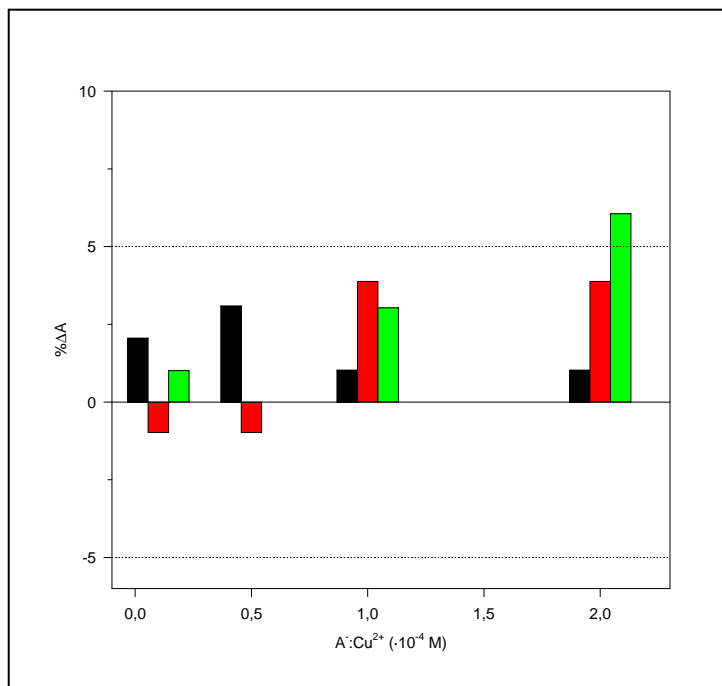


Figura 2.13. Efecto de la adición de cloruros (■), nitratos (■) y sulfatos (■) en la absorbancia de una muestra que contiene 50 µg·L⁻¹ Cu(II).

Nitrito y Perclorato. En el caso del perclorato, los resultados que se alcanzan son similares a los obtenidos para los aniones anteriores, esto es, no se observaron interferencias hasta la relación molar más alta estudiada (20.000). No obstante, en el caso de los nitritos, para la relación molar más baja (1.000) ya se obtenían interferencias, por lo que se decidió disminuir el intervalo para determinar la relación molar a la que la adición de esta especie no producía interferencias. Así, en la figura 2.14 se muestran los resultados obtenidos para el intervalo comprendido entre 0 y 1.000. De la misma se observa que la adición de NaNO₂ a la disolución que contiene 50 µg·L⁻¹ Cu(II) no produce interferencias en una relación molar nitrito:cobre de hasta 500.

CAPÍTULO 2

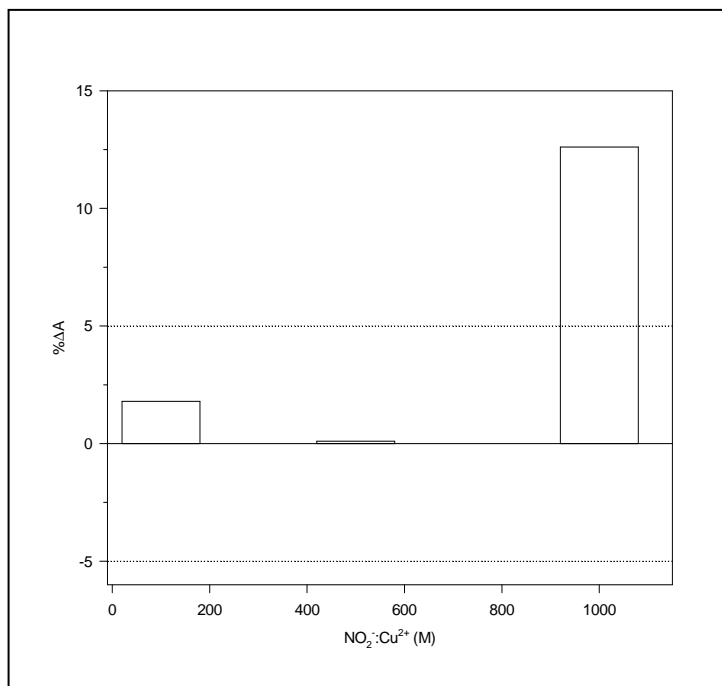


Figura 2.14. Efecto de la adición de NaNO_2 en la absorbancia de una muestra que contiene $50 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ Cu(II) .

Bromuro, fluoruro y yoduro. Para éstos se estudió el efecto que producía la adición de las disoluciones de KBr , NH_4F y KI . En la figura 2.15 se presentan los resultados obtenidos. Como se puede observar, ninguno de ellos presenta interferencias al menos hasta las relaciones molares más altas estudiadas.

Acetato. En esta ocasión tan sólo se estudiaron las correspondientes sales sódica y amónica. Los resultados alcanzados se muestran en la figura 2.16. Como se puede observar, la sal amónica no presenta interferencias hasta la relación molar más alta estudiada, mientras que la correspondiente sal sódica presenta una variación de aproximadamente el 6 % para la relación molar más alta estudiada. Este resultado es ligeramente superior al valor tomado como referencia en el criterio establecido para determinar si una especie se podía considerar o no como interferencia. No obstante, y dado que la sal amónica no interfiere en las medidas, se puede concluir que la adición de acetato a la muestra no produce interferencias hasta, al menos, la relación molar más alta estudiada.

Desarrollo, optimización y validación de nuevos métodos analíticos

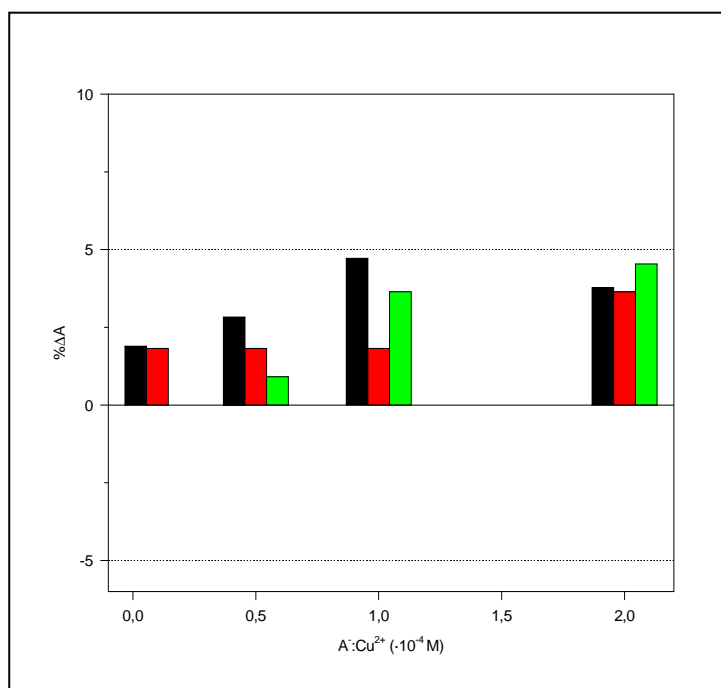


Figura 2.15. Efecto de la adición de KBr (■), NH₄F (■) y KI (■) en la absorbancia de una muestra que contiene 50 µg·L⁻¹ Cu(II).

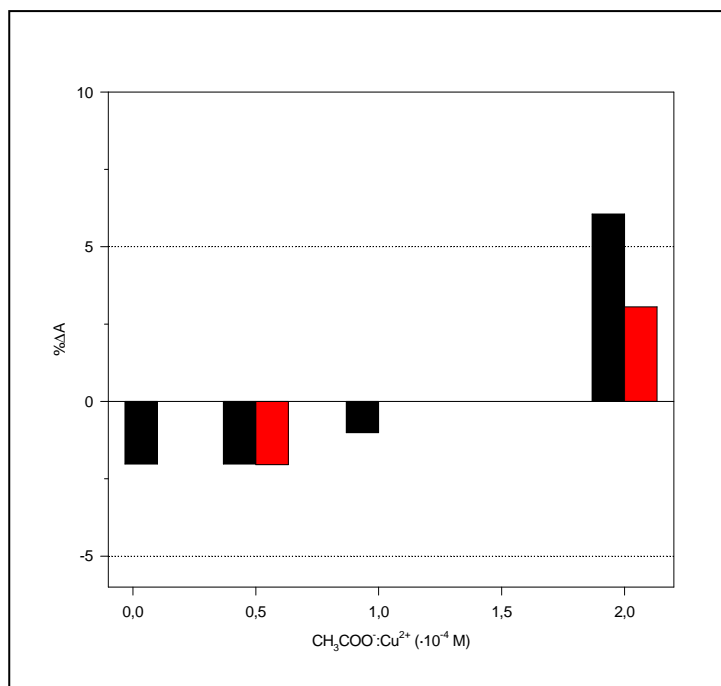


Figura 2.16. Efecto de la adición de NaCH₃COO (■) y NH₄CH₃COO (■) en la absorbancia de una muestra que contiene 50 µg·L⁻¹ Cu(II).

CAPÍTULO 2

Oxalato, citrato y tartrato. Para estos iones se prepararon las disoluciones en las diferentes relaciones molares a partir de las sales correspondientes, $(\text{NH}_4)_2\text{C}_2\text{O}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ y $\text{KSbC}_4\text{H}_4\text{O}_7 \cdot \frac{1}{2} \text{H}_2\text{O}$, para oxalato, citrato y tartrato, respectivamente. En la figura 2.17 se detallan los resultados conseguidos. La adición de oxalato no sólo no interfiere hasta la relación molar más alta estudiada sino que además no producía ninguna variación en la absorbancia con respecto de la disolución que contenía tan sólo el cobre, de ahí que en la gráfica no aparezca. Además, la adición de citrato tampoco producía interferencias al menos, hasta las relación molar más alta estudiada. Por último, la adición de tartrato presenta interferencias a partir de una relación molar de 10.000, pudiendo en este caso estar influenciado por la presencia de antimonio.

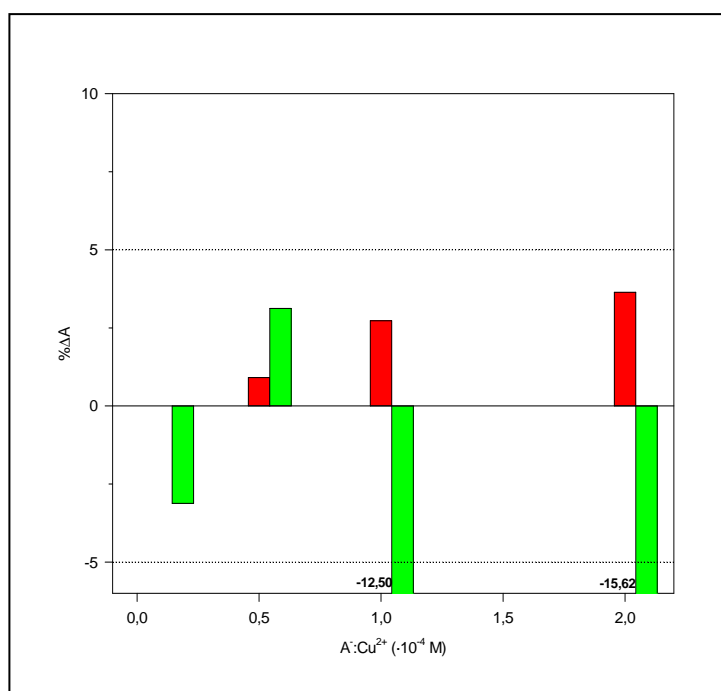


Figura 2.17. Efecto de la adición de $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ (■) y $\text{KSbC}_4\text{H}_4\text{O}_7 \cdot \frac{1}{2} \text{H}_2\text{O}$ (■) en la absorbancia de una muestra que contiene $50 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1} \text{Cu(II)}$.

Desarrollo, optimización y validación de nuevos métodos analíticos

Visto todo lo anterior, en la tabla 2.5 se muestran de manera resumida los resultados obtenidos en el estudio de interferencias causadas por las especies aniónicas. Como puede observarse, los aniones más comunes no causan efecto sobre la absorbancia del complejo hasta valores de relación molar de 20.000. Tan sólo el tartrato y el nitrito causan algún efecto, siendo éste apreciable únicamente para valores de concentración elevados. Ello es probablemente debido a que el primero compleja el cobre y el segundo lo reduce, por lo que en ambos casos va disminuyendo la concentración de cobre complejado con la dPKBH como consecuencia del aumento de concentración de la especie interferente.

Tabla 2.5. Efecto de la adición de especies interferentes sobre la absorbancia de la muestra utilizada como control.

Anión	Relación Molar (anión/Cu)
Cl ⁻ , Br ⁻ , F ⁻ , I ⁻ , NO ₃ ⁻ , SO ₄ ²⁻ , ClO ₄ ⁻ , citrato, oxalato, acetato	> 20.000
Tartrato	5.000
NO ₂ ⁻	500

Cationes

En la mayoría de los casos se ha partido de disoluciones patrón de 1 g·L⁻¹ del catión correspondiente y se han efectuado las diluciones adecuadas para tener en la disolución final las relaciones molares oportunas.

Los cationes sodio, potasio y amonio se estudiaron de forma simultánea a los aniones, ya que las sales empleadas para éstos eran sódicas, potásicas o amónicas. Así, los resultados obtenidos, que se muestran en la figura 2.18, se calcularon como la media de los valores de absorbancia que presentaban en cada una de las sales en las que se encontraban presentes en el estudio de los aniones. Como puede observarse, la adición de éstos no afectó a la medida hasta la relación molar más alta estudiada.

CAPÍTULO 2

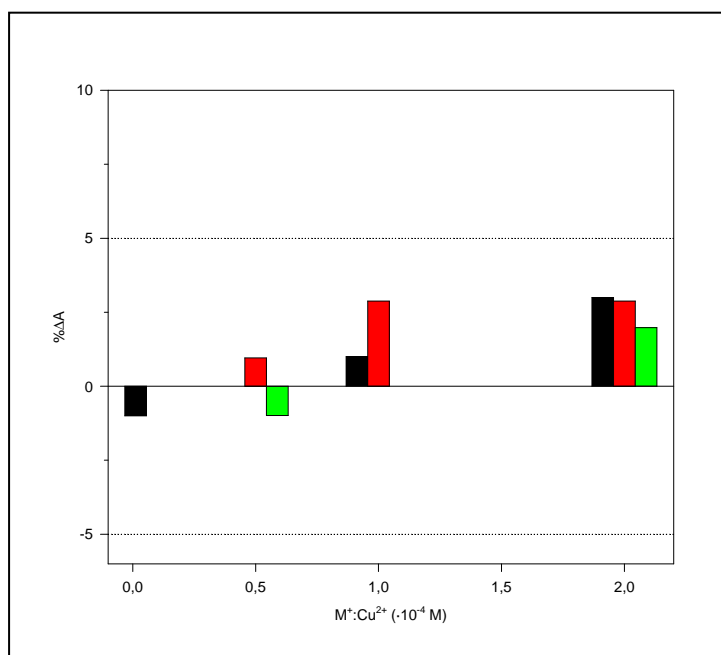


Figura 2.18. Efecto de la adición de Na⁺ (■), K⁺ (■) y NH₄⁺ (■) en la absorbancia de una muestra que contiene 50 µg·L⁻¹ Cu(II).

Para el resto de metales ensayados, los resultados se presentan en función de su pertenencia a los distintos grupos principales del sistema periódico o a las diferentes series de transición, como se muestra en la tabla 2.6. Para todos ellos, se utilizó el criterio ya mencionado en el caso de los aniones, esto es, una especie fue considerada interferente cuando producía una variación de la absorbancia del complejo Cu(II)-dPKBH superior, en valor absoluto, al 5%.

Tabla 2.6. Cationes ensayados como posibles interferentes.

Grupo	Cationes
2	Be(II), Mg(II), Ca(II), Sr(II), Ba(II)
13	Al(III)
14	Si(IV), Sn(II), Pb(II)
15	As(V), Sb(III), Bi(III)
16	Se(IV)
1ª Serie transición	Ti(IV), V(V), Cr(III), Mn(II), Fe(III), Co(II), Ni(II), Zn(II)
2ª Serie transición	Mo(VI), Ag(I), Cd(II)
3ª Serie transición	Hg(II)

Desarrollo, optimización y validación de nuevos métodos analíticos

Elementos del grupo 2. Se estudiaron los efectos que producían en la absorbancia de una muestra que contenía $50 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ de Cu(II) la adición de Be, Mg, Ca, Sr y Ba en relaciones molares comprendidas en el intervalo entre 0 y 1.000 respecto del cobre. Como puede observarse en la figura 2.19 (a), los resultados indican que para los cationes Be(II) y Ca(II) aparecen interferencias para las relaciones molares más altas estudiadas para ellos, esto es, para una relación metal:cobre 1:300, mientras que éstas aparecen para la relación 1:200 en el caso de Mg(II). En este sentido, se puede concluir que los cationes Be(II) y Ca(II) pueden encontrarse en relaciones molares 200:1 respecto de cobre sin presentar interferencias y Mg(II) hasta una relación 100:1. Por otra parte, en la figura 2.19 (b) se muestran los resultados obtenidos para los otros dos metales (Sr(II) y Ba(II)). Para ambos, las interferencias aparecen para relaciones molares más elevadas que en los casos anteriores. Así, la presencia de Sr(II) en la disolución que contiene Cu(II) no interfiere hasta una relación molar de 500:1, mientras que aumenta hasta el doble para el caso de Ba(II).

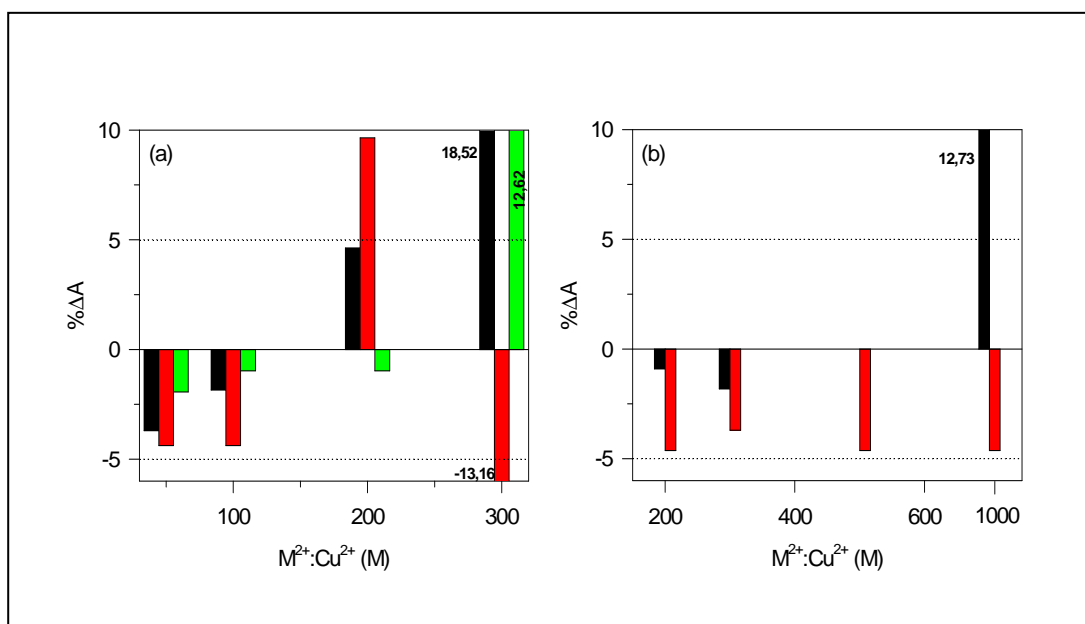


Figura 2.19. Efecto de la adición de alcalinotérreos en la absorbancia de una muestra que contiene $50 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ Cu(II). (a) Be(II) (■), Mg(II) (■) y Ca(II) (■); (b) Sr(II) (■) y Ba(II) (■)

Elementos de los grupos 13 a 16. Del mismo modo que en el caso anterior, los resultados obtenidos se muestran en dos figuras, debido a las diferencias en las relaciones molares estudiadas. Así, en la figura 2.20 (a) se muestran los resultados

CAPÍTULO 2

obtenidos para los metales con las relaciones molares más bajas respecto de cobre. Como puede observarse, Sn(II) no produce interferencias en un exceso respecto de cobre de hasta 20 veces en relación molar, mientras que Al(III) y Bi(III) no interfieren en relación 10:1. Por último, Pb(II) es el que presenta un límite de tolerancia más bajo. En la figura 2.20 (b) se muestran aquellos metales cuyas relaciones molares fueron más altas. En este caso, Sb(III) puede encontrarse en una relación molar de hasta 2.000 veces con respecto de Cu(II) sin causar interferencias, dicha relación disminuye hasta 1.000 para el caso de As(V), mientras que Se(IV) y Si(IV) pueden encontrarse hasta 175 veces.

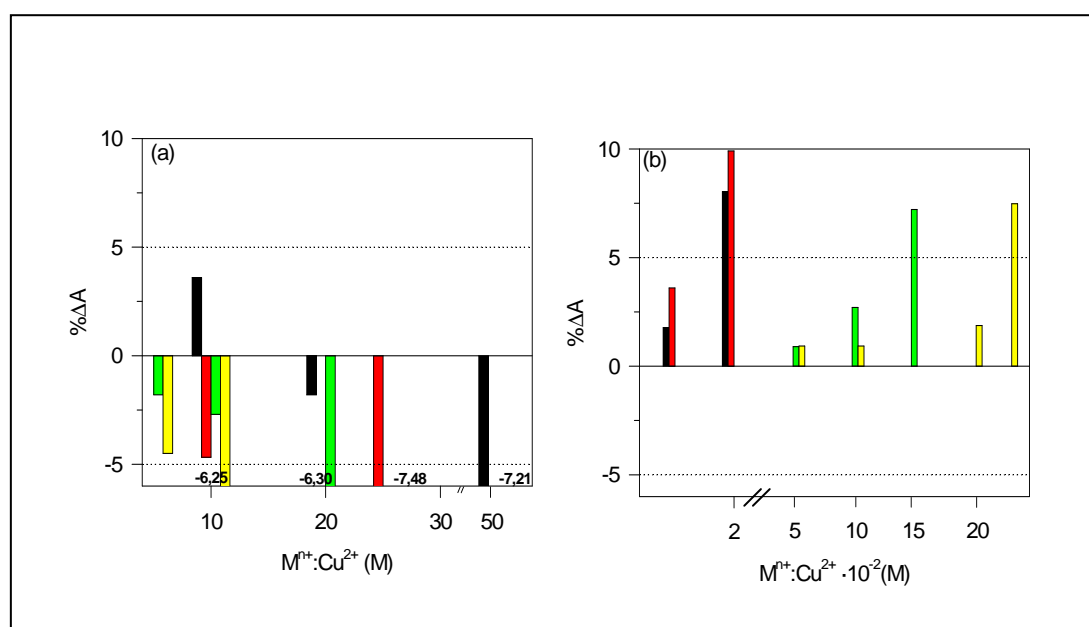


Figura 2.20. Efecto de la adición de: (a) Al(III) (■), Bi(III) (■), Sn(II) (■) y Pb(II) (■); (b) Se(IV) (■), Si(IV) (■), As(V) (■) y Sb(III) (■), en la absorbancia de una muestra que contiene 50 µg·L⁻¹ Cu(II).

Elementos de la 1ª Serie de Transición. Debido a los diferentes intervalos en los que se estudiaron las relaciones molares entre los metales y el cobre, los resultados obtenidos se recogen en dos figuras, igual que en los casos precedentes. Así, en la figura 2.21 (a) se muestran los metales cuyos límites de tolerancia son más bajos. Como puede observarse, Co(II), Ni(II) y Zn(II) presentan las interferencias más importantes, ya que producen variaciones significativas en la absorbancia de la muestra a partir de una

Desarrollo, optimización y validación de nuevos métodos analíticos

relación molar con Cu(II) de 0,25. Para el resto de metales de este grupo, cuyos resultados se muestran en la figura 2.21 (b), se observa cómo a medida que aumenta el estado de oxidación de los mismos la relación molar a la que causan interferencias también es mayor, V(V) no interfiere hasta una relación molar con Cu(II) 100:1, mientras que Fe(III) y Cr(III) interfieren en relación molar 20:1.

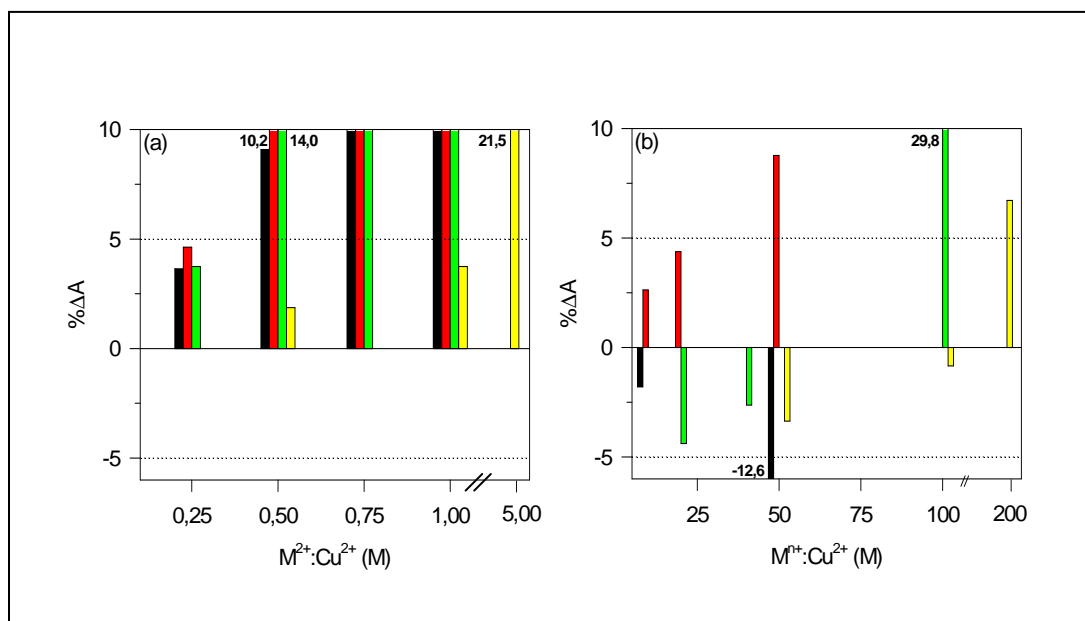


Figura 2.21. Efecto de la adición de: (a) Co(II) (■), Ni(II) (■), Zn(II) (■) y Mn(II) (■); (b) Cr(III) (■), Fe(III) (■), Ti(IV) (■) y V(V) (■) en la absorbancia de una muestra que contiene 50 µg·L⁻¹ Cu(II).

Elementos de la 2ª y 3ª Series de Transición. Del mismo modo que en los casos precedentes, los resultados obtenidos se muestran en dos figuras. Así, como se puede observar en la figura 2.22 (a), Cd(II) y Hg(II) presentan interferencias importantes para relaciones molares de 0,5. No obstante, estos elementos suelen encontrarse habitualmente a niveles de concentración muy bajos con respecto a cobre en aguas naturales, por lo que su presencia en muestras reales no afectará a la medida. Por otro lado, los resultados obtenidos para los otros dos metales, figura 2.22 (b), indican que su presencia en concentraciones altas respecto a la de cobre no causan interferencias.

En la tabla 2.7 se muestran, a modo de resumen, los resultados obtenidos, tanto para cationes como para aniones.

CAPÍTULO 2

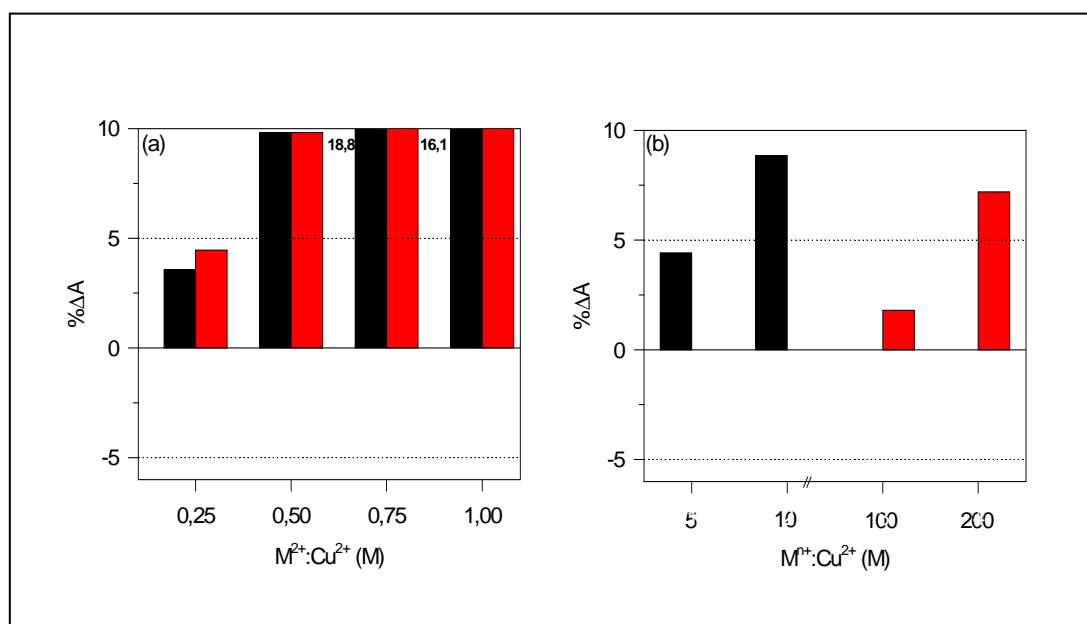


Figura 2.22. Efecto de la adición de: (a) Cd(II) (■) y Hg(II) (■); (b) Ag(I) (■) y Mo(VI) (■) en la absorbancia de una muestra que contiene 50 µg·L⁻¹ Cu(II).

Tabla 2.7. Relaciones máximas toleradas por la muestra utilizada como control.

Ión	Relación Molar (ión/Cu)
Cl ⁻ , Br ⁻ , F ⁻ , I ⁻ , NO ₃ ⁻ , SO ₄ ²⁻ , ClO ₄ ⁻ , Na ⁺ , K ⁺ , NH ₄ ⁺ , citrato, oxalato, acetato	> 20.000
Tartrato	5.000
Sb(III)	2.000
As(V), Ba(II)	1.000
NO ₂ ⁻ , Sr(II)	500
Ca(II), Be(II)	200
Se(IV), Si(IV)	175
Mo(VI), V(V), Mg(II)	100
Ti(IV)	50
Cr(III), Fe(III), Sn(II)	20
Al(III), Bi(III)	10
Pb(II), Ag(I)	5
Mn(II)	1
Co(II), Ni(II), Zn(II), Cd(II), Hg(II)	0,25

Desarrollo, optimización y validación de nuevos métodos analíticos

Como se desprende de los resultados expuestos en esta tabla, se pueden establecer las siguientes conclusiones:

- La mayoría de los aniones ensayados, así como los cationes Na^+ , K^+ y NH_4^+ , no producen interferencias en la medida de la muestra, a las relativamente altas concentraciones toleradas.
- En general, para aquellos elementos cuyos estados de oxidación son distintos de dos, se obtienen mayores límites de tolerancia.
- Los elementos de las distintas series de transición cuyo estado de oxidación predominante es dos son los que presentan las mayores interferencias incluso a niveles de concentración inferiores a los de cobre, como es el caso de Co, Ni, Zn, Cd y Hg, lo cual está relacionado probablemente con la formación de complejos coloreados similares con el ligando quelatante.

Estudio de Enmascarantes

En el estudio precedente se ha mostrado que existe una serie de elementos cuya presencia, incluso a niveles de concentración inferiores a los que se encuentra el cobre, pueden producir interferencias en la medida. No obstante, la mayoría no representan un grave problema, ya que en muchos casos se presentan en concentraciones muy inferiores al cobre en muestras ambientales (como por ejemplo, Hg(II) o Cd(II) en aguas naturales). A pesar de ello, siguen existiendo algunas especies químicas cuya presencia en muestras reales puede estar en concentraciones similares a las de cobre, interfiriendo de este modo su cuantificación. Por tanto, se hace necesaria la búsqueda de posibles compuestos que, adicionados a la muestra en determinadas concentraciones, minimicen o incluso eliminen los efectos producidos por los interferentes, y al mismo tiempo no afecten a la determinación del cobre.

El término enmascaramiento define un proceso mediante el cual una sustancia interferente reacciona con una(s) sustancia(s) adecuada(s) adicionada(s) a la muestra, de manera que la concentración libre del interferente se reduce por debajo del límite en el que causa interferencia. Las reacciones de enmascaramiento más habituales son de precipitación, complejación o redox.

CAPÍTULO 2

Por ello se han investigado posibles agentes complejantes, que minimizan al máximo la manipulación de la muestra, evitando, por ejemplo, la adición de reactivos que diesen lugar a reacciones de precipitación. Además, estas especies no deben reaccionar con el cobre presente en la muestra. En este sentido, de los posibles agentes enmascarantes encontrados en la bibliografía se han ensayado el fluoruro amónico y el citrato sódico, los cuales, como se ha mostrado en la tabla 2.5 no causan interferencias en las medidas de cobre en relaciones molares con éste de hasta 20.000.

Para determinar la efectividad de los mismos se prepararon disoluciones que contenían $50 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ Cu(II); $3,25\cdot 10^{-4} \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ dPKBH; $1,65\cdot 10^{-2} \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ tampón de fosfato y 10% etanol, cuya medición espectrofotométrica a 370 nm, frente a su blanco correspondiente, se compara con la obtenida con otras dos disoluciones idénticas que contienen además, el ión interferente sólo, y en presencia del agente enmascarante, respectivamente. Los valores obtenidos se expresan como porcentajes de variación de la absorbancia respecto de la disolución que contiene tan sólo el analito.

Así pues, de los resultados mostrados en la tabla 2.8, se desprende que la adición de $\text{NH}_4\text{F } 8\cdot 10^{-4} \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ puede utilizarse para eliminar las interferencias provocadas por Al(III) en un exceso respecto de Cu(II) de hasta 25 veces, mientras que una concentración final de $\text{NH}_4\text{F } 8\cdot 10^{-3} \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ es suficiente para Mg(II) y Mn(II) cuando se encuentran en un exceso de 200 y 2 veces, respectivamente. También, como se desprende de la tabla 2.9, el uso de $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7\cdot 2\text{H}_2\text{O } 0,2 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ permite enmascarar las interferencias causadas por Zn(II) en relación molar 1:1 con Cu(II) y en relaciones molares 0,5:1 para Cd(II) y Ni(II).

Tabla 2.8. Efecto de la adición de NH_4F como enmascarante.

IÓN Interferente(ión:cobre)	$\text{NH}_4\text{F } (10^{-3} \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1})$				
	0	0,4	0,8	8,0	16,0
Aluminio (25:1)	-8,08 %	- 6,06 %	1,01 %	----	----
Magnesio (200:1)	8,82 %	8,04 %	6,89 %	3,92 %	2,94 %
Manganeso (2:1)	14,43 %	11,04 %	8,36 %	2,06 %	1,03 %

Desarrollo, optimización y validación de nuevos métodos analíticos

Tabla 2.9. Efecto de la adición de $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ como enmascarante.

IÓN Interferente (ión:cobre)	$\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ($\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)				
	0	0,05	0,1	0,2	0,25
Cinc (1:1)	37,74 %	24,53 %	10,38 %	2,83 %	----
Níquel (1:1)	30,27 %	19,27 %	17,43 %	13,76 %	13,76 %
Níquel (0,5:1)	15,31 %	9,09 %	6,52 %	4,54 %	----
Cadmio (1:1)	30,00 %	18,18 %	14,54 %	11,82 %	10,00 %
Cadmio (0,5:1)	12,28 %	8,77 %	6,14 %	3,51 %	----

Exactitud

Se han utilizado dos Materiales de Referencia Certificados (Silicon Brass C31X WSB 10 y Cu/Be/Co alloy C36X CBC 40), suministrados por MBH Analytical Ltd. Ambas muestras se disgregaron utilizando el procedimiento que se describe a continuación:

Latón Silicatado (C31X WSB 10). Este material se suministra en forma de lascas de diversos tamaños. Para disolverlo se pesan exactamente 0,5000 g de la muestra en una placa de teflón y se añaden 4 mL de una mezcla $\text{HNO}_3:\text{HCl}$ (3:1) calentando suavemente. Seguidamente, se adicionan unos 10 mL de agua bidestilada y se continúa con el calentamiento. Tras añadir unas gotas de HF concentrado, se calienta la muestra hasta su completa disolución. Por último, se deja enfriar y se trasvasa el contenido de la placa a un matraz aforado enrasando a 100 mL con agua bidestilada.

Esta muestra presenta un contenido certificado para cobre de 73,513%. Por tanto, en el matraz aforado de 100 mL existe una concentración inicial de $3.675,5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ de Cu(II). Para llevar a cabo las medidas espectrofotométricas se realiza una dilución 1:4.000 de la disolución original, siendo por tanto la concentración final de cobre $0,919 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$.

Aleación de Co/Be/Cu (C36X CBC 40). Este material de referencia se suministra en forma de lascas de diversos tamaños. Del mismo modo que en el

CAPÍTULO 2

caso anterior, para conseguir su disolución se pesan 0,4500 g de la muestra en una placa de teflón y tras añadir 3,5 mL de la mezcla $\text{HNO}_3\text{:HCl}$ (3:1) se calienta suavemente. Transcurridos unos minutos, la muestra se disuelve completamente, por lo que se deja enfriar y se enrasa en matraz aforado de 100 mL.

El contenido de cobre certificado para esta muestra es del 97,347%, de donde la concentración inicial de éste en el matraz de 100 mL es de $4.386,8 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$. Igual que en el caso de la muestra anterior, se realiza una dilución 1:4.000 para realizar las medidas espectrofotométricas, resultando una concentración de cobre de $1,097 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$.

Una vez en disolución ambas muestras se procede a su medida utilizando el método desarrollado. Para ello, cada una de las muestras de referencia se analiza por triplicado. Los resultados que se obtienen para cada una de ellas se encuentran en la tabla 2.10. En ésta se muestran también los valores de incertidumbre en la determinación, expresados en forma de desviación estándar, presentados entre paréntesis, así como su exactitud, expresada como error relativo (ϵ_r), y como porcentaje de recuperación (%R). Los valores obtenidos para el porcentaje de recuperación indican que el método proporciona valores aceptables para ambas muestras, verificándose de este modo su exactitud.

Tabla 2.10. Resultados obtenidos en el análisis de las muestras de referencia.

Muestra	[Cu(II)]_{certificada} ($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$)	[Cu(II)]_{encontrada} ($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$)	ϵ_r (%)	%R
C31X WSB 10	0,919	0,929 ($\pm 0,005$)	1,09	101,1
C36X CBC 40	1,097	1,122 ($\pm 0,011$)	2,28	102,3

De los resultados obtenidos en este estudio de validación, podemos concluir que el método propuesto para la determinación de cobre en aguas naturales demuestra ser exacto, preciso, con un amplio intervalo de linealidad (hasta $3 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de Cu(II)), un límite de detección mejor que la gran mayoría de métodos espectrofotométricos y del mismo orden de magnitud que algunos métodos atómicos y selectivo cuando se emplean los agentes enmascarantes apropiados.

Desarrollo, optimización y validación de nuevos métodos analíticos

A continuación se indica el procedimiento a seguir para la determinación de cobre en aguas naturales utilizando el método propuesto:

A una alícuota de muestra que contenga entre 8,4 y 3.000 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ de Cu(II) se le añade, siguiendo el orden que se indica a continuación, la disolución reguladora de fosfatos (concentración final $1,65\cdot 10^{-2}$ M), la disolución de dPKBH (concentración final $3,25\cdot 10^{-4}$ M) y el volumen necesario de etanol para alcanzar un 10% v/v final. Para eliminar el efecto de posibles especies interferentes se adicionan también una disolución de citrato trisódico (concentración final 0,1 M) y otra de fluoruro amónico (concentración final 0,04 M) antes de la adición de los reactivos. Agitar suavemente para que se produzca la reacción de formación del complejo y medir la absorbancia a 370 nm. Calcular la concentración de analito en la muestra a partir de la gráfica de calibrado preparada a tal efecto.

3.1.4. Aplicación a muestras reales

Una vez validado el método, éste se aplicó a muestras reales con matrices diferentes para cuantificar la concentración de Cu(II) en cada una de ellas. Una de las muestras utilizadas es de agua potable obtenida del grifo directamente. Dicha muestra fue previamente analizada por espectroscopia de absorción atómica de llama para conocer el contenido, tanto de cobre, como de otros elementos (véase la tabla 2.11). Esta muestra se analiza mediante el método propuesto y añadiendo agentes enmascarantes para eliminar las interferencias de las distintas especies. De este modo, los matraces que contenían las muestras presentaban una concentración final 0,1 M de citrato trisódico y 0,04 M de fluoruro amónico. Las muestras se analizan por triplicado.

La composición de cobre y otros elementos en la otra muestra acuosa, agua de río, se determina mediante espectroscopía de emisión atómica de plasma acoplado inductivamente. Para realizar su análisis utilizando el método desarrollado, la muestra se diluye previamente (1:10) y se miden tres réplicas de la misma a las que también se les adicionan previamente los enmascarantes anteriormente citados (citrato y fluoruro).

En la tabla 2.11 se muestran los resultados obtenidos en el análisis de ambas

CAPÍTULO 2

muestras. Como puede observarse, los valores tanto de precisión como de exactitud obtenidos indican la adecuación del nuevo método propuesto para el análisis de trazas de cobre, incluso cuando están presentes otros elementos que son susceptibles de causar interferencias en la cuantificación del cobre, pero cuya perjudicial influencia es evitada por reacciones de enmascaramiento. Además, en la última columna se muestran los valores del estadístico t de la distribución de Student calculados para comparar los resultados obtenidos con el método propuesto y con los de referencia. Este parámetro adopta un valor de 4,30 para 2 grados de libertad y un nivel de probabilidad del 95%. Como se puede observar, los valores obtenidos para este parámetro son inferiores al tabulado, lo cual nos indica que no existen diferencias estadísticamente significativas entre ambos resultados.

Tabla 2.11. Resultados obtenidos en el análisis de las muestras acuosas.

Muestra	[Cu(II)] _{ref} μg·L ⁻¹	[Cu(II)] _{enc} μg·L ⁻¹	Otros elementos presentes μg·L ⁻¹	ε _r (%)	t (95%)
Agua potable	13,21 (± 0,44) ^a	13,53 (± 0,87) ^c	Zn: 30,90 Fe: 41,07 Al: 146,66 Mn: 2,56	2,42	0,57
Agua de río	542 (± 42) ^b	564 (± 17) ^c	Zn: 590 Fe: 604 Pb: 63,8	4,06	0,84

^a FAAS

^b AES-ICP

^c Presente método

3.2. DETERMINACIÓN DE TRAZAS DE CINC MEDIANTE LA FORMACIÓN DE UN QUELATO COLOREADO

A continuación se muestran los resultados obtenidos para la determinación de cinc siguiendo el procedimiento descrito en el desarrollo experimental.

3.2.1. Ensayos Preliminares

Para ello, inmediatamente después de mezclar todas las disoluciones se registra el espectro de absorción del complejo Zn(II)-dPKBH frente a un blanco del reactivo preparado añadiendo la misma cantidad de dPKBH en etanol y disolución reguladora que en la disolución que contenía el cinc. De dicho espectro se desprende que la máxima absorbancia del complejo aparece a 370 nm, por lo que en adelante, los diferentes estudios de optimización del sistema se llevaron a cabo a dicha longitud de onda. En la figura 2.23 se muestra el espectro de absorción del complejo Zn(II)-dPKBH frente a su blanco correspondiente.

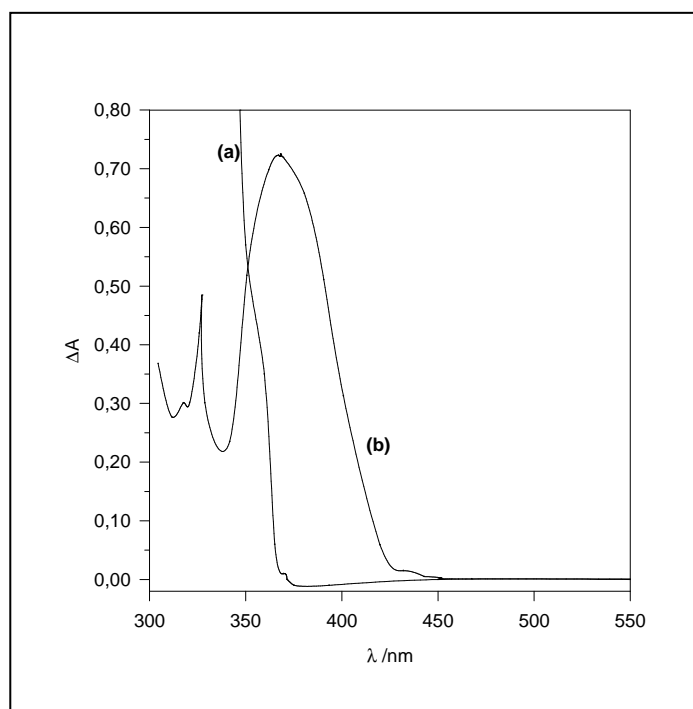


Figura 2. 23. Espectros de absorción. (a) blanco del reactivo ([dPKBH] = $3,25 \cdot 10^{-4}$ mol·L⁻¹; pH = 8; 10% v/v etanol) y (b) complejo Zn(II)-dPKBH ([Zn(II)] = 1 mg·L⁻¹; [dPKBH] = $3,25 \cdot 10^{-4}$ mol·L⁻¹; pH = 8; 10% v/v etanol).

CAPÍTULO 2

3.2.2. Optimización de las condiciones de formación del complejo

Efecto del pH del medio

Para estudiar el efecto de esta variable en la absorbancia del complejo se prepararon distintas disoluciones en matraces de 10 mL que contenían $1 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de Zn(II) , $3,25\cdot 10^{-4} \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ dPKBH y 10% v/v de etanol. El pH de las mismas se varió del mismo modo que en el caso del complejo de cobre. Durante este proceso se observó cómo a medida que aumentaba la basicidad de las disoluciones que contenían cinc comenzaba a aparecer una ligera turbidez blanquecina en los matraces poco tiempo después de formarse el complejo. Este hecho puede relacionarse con el comportamiento que presenta el catión en disolución acuosa, el cual se encuentra libre en medio ácido pero comienza a precipitar el hidróxido (Zn(OH)_2) a partir de $\text{pH } 7,5^{212}$. En consecuencia, se realizaron las medidas de absorbancias inmediatamente después de la preparación, así como a los 2, 5 y 10 minutos de formarse el complejo de Zn(II) -dPKBH. Los resultados que se obtuvieron se detallan en la figura 2.24. En ésta pueden distinguirse dos zonas en las que el comportamiento del sistema es diferente. En la primera, en la que el pH es ácido y por tanto el catión está libre en disolución, la absorbancia del complejo aumenta con éste hasta llegar a 6,4-7. En la segunda, a medida que aumenta la basicidad del sistema ($\text{pH} > 7,5$) la absorbancia disminuye otra vez, siendo además el descenso de ésta más pronunciado a medida que aumenta el tiempo de medida. Esto se justifica como consecuencia de que a partir de $\text{pH } 7,5$ comienza la precipitación del hidróxido.

Además, cuando se realizan las medidas espectrofotométricas inmediatamente después de formarse el complejo, la zona óptima de pH está comprendida entre 6,4 y 10. No obstante, a medida que transcurre el tiempo el intervalo de pH óptimo se reduce, de forma que sólo para el intervalo de pH comprendido entre 6,4 y 7 la absorbancia del complejo formado es independiente del tiempo de medida.

²¹² Burriel Martí, F.; Lucena Conde, F.; Arribas Jimeno, S.; Hernández Méndez, J. *Química Analítica Cualitativa*. p. 692. Ed. Paraninfo, 2006.

Desarrollo, optimización y validación de nuevos métodos analíticos

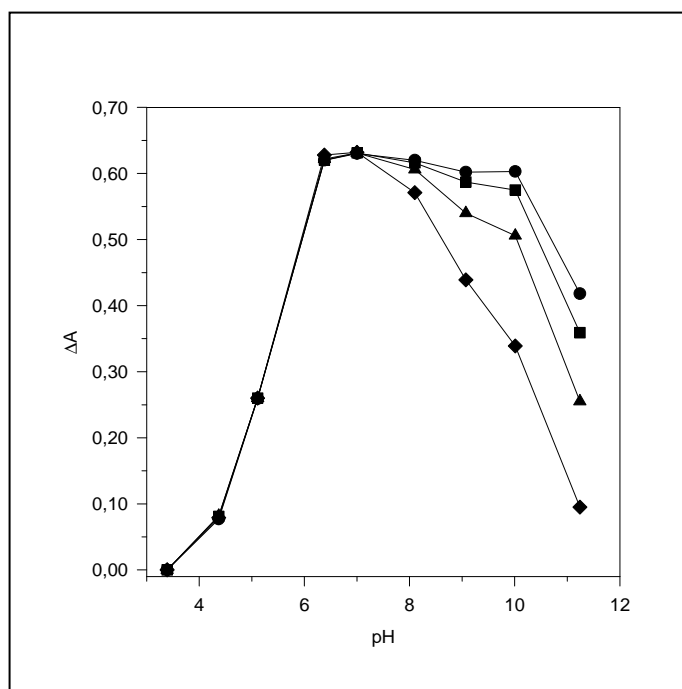


Figura 2.24. Efecto del pH. Absorbancia del complejo Zn(II)-dPKBH en función del tiempo (• 0'; ■ 2'; ▲ 5'; ◆ 10') transcurrido desde su formación. $[Zn(II)] = 1 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$; $[dPKBH] = 3,25\cdot 10^{-4} \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$; 10% v/v etanol.

Por tanto, a partir de los resultados obtenidos se seleccionó $\text{pH} = 6,4$ como pH óptimo para el desarrollo del complejo coloreado.

Control del pH del medio

Los resultados mostrados anteriormente ponen de manifiesto la necesidad de realizar un control estricto de las condiciones de acidez del sistema de reacción para que la formación del complejo tenga lugar adecuadamente. En este sentido, y al objeto de obtener la máxima sensibilidad para el nuevo método espectrofotométrico, se hace aún más importante, si cabe, la elección de una disolución reguladora adecuada para mantener constante, (y en torno a 6,4), el pH de cada una de las disoluciones que vayan a medirse. Así, se seleccionó en primer lugar la disolución reguladora formada por el sistema del ácido fosfórico, que como ya se mencionó para el caso del cobre puede intercambiar hasta tres protones con valores de pK de 2,15 (pK_1), 7,20 (pK_2) y 12,74 (pK_3), respectivamente. Por tanto, su utilización en el intervalo de pH comprendido entre 6,4 y 7 estará gobernada por el intercambio de un protón según el equilibrio:

CAPÍTULO 2



Posteriormente, se determinó la concentración final de dicha disolución necesaria para mantener el pH de la muestra en el valor deseado. Para ello, se prepararon distintas disoluciones en matraces de 10 mL que contenían $1 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de Zn(II) ; $3,25\cdot 10^{-4} \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ de dPKBH y 10% v/v de etanol, así como sus correspondientes blancos, y se varió la concentración final de la disolución reguladora en cada una entre $2,5\cdot 10^{-3} \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ y $1,0\cdot 10^{-2} \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$. Inmediatamente después de la mezcla de todos los reactivos se efectuaba la medida espectrofotométrica a 370 nm de cada disolución ensayada frente a su blanco correspondiente. En la figura 2.25 se presentan los resultados que se obtienen, indicando las barras verticales el error asociado a las medidas efectuadas por triplicado a disoluciones duplicadas. Como se puede observar, la absorbancia del complejo alcanza una zona de estabilidad a partir de $3,5\cdot 10^{-3} \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ y hasta $10^{-2} \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ (concentración más alta ensayada). Por tanto, dado que la disolución que contenía una concentración de reguladora $5\cdot 10^{-3} \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ proporcionaba una respuesta adecuada para el complejo formado, y permitía muestras con valores de pH diferentes, ésta se seleccionó como concentración óptima.

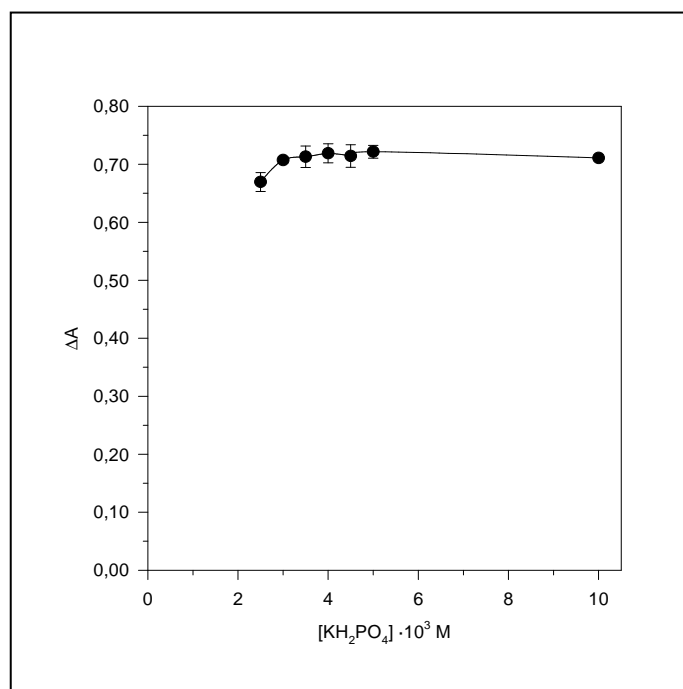


Figura 2.25. Efecto de la concentración de la disolución reguladora. $[\text{Zn(II)}] = 1 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$; $[\text{dPKBH}] = 3,25\cdot 10^{-4} \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$; 10% v/v etanol. pH = 6,4.

Desarrollo, optimización y validación de nuevos métodos analíticos

Concentración óptima de dPKBH

Se ha estudiado el efecto que provoca en la señal analítica la variación de la concentración de reactivo quelatante. En este sentido, y considerando que todos los ensayos anteriormente descritos se habían efectuado para una concentración de analito de $1 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$, se varió la concentración final de dPKBH en la disolución de manera que ésta abarcara el intervalo comprendido entre $1,3\cdot 10^{-5} \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ y $6,6\cdot 10^{-4} \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$. De este modo, se alcanzan relaciones molares ligando: Zn(II) desde 1:1 hasta un exceso considerable del mismo (50:1). En la figura 2.26 se muestran los resultados a los que se llegan, indicando la línea la tendencia de los puntos y las barras verticales la desviación estándar asociada a las medidas efectuadas por triplicado en disoluciones duplicadas.

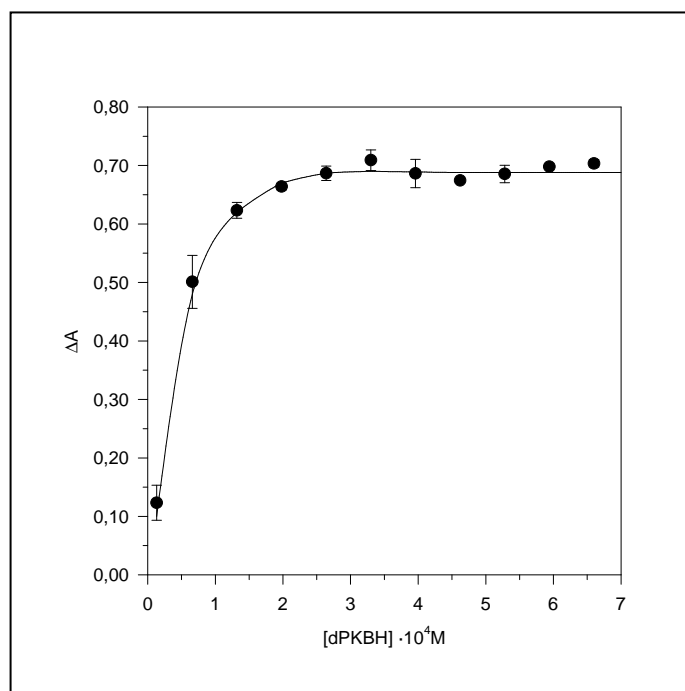


Figura 2.26. Efecto de la concentración de dPKBH.
[Zn(II)]=1 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$; $[\text{KH}_2\text{PO}_4] = 5,0\cdot 10^{-3} \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$; 10% v/v etanol.

Como se puede observar, se produce un rápido aumento de la absorbancia del complejo cuando se aumenta la concentración de reactivo, alcanzándose una zona de estabilidad en la que la señal permanece prácticamente independiente de la concentración del ligando. De este modo, y habida cuenta que las muestras reales presentarán siempre menores concentraciones de Zn(II) , es suficiente utilizar cualquier

CAPÍTULO 2

concentración de reactivo superior a $3 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$. Para minimizar tanto el coste del análisis como la generación de residuos, se optó por utilizar una concentración de $3,25 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ de dPKBH.

Naturaleza acuoetanólica del medio

Como en el caso del complejo cobre-ligando, para estudiar el efecto del contenido etanólico del medio se preparan diversas disoluciones que contienen $1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ de Zn(II); $3,25 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ dPKBH y $5,0 \cdot 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ de disolución reguladora, así como sus blancos correspondientes, y se varía el porcentaje final de etanol en las mismas en el intervalo comprendido entre 2,5-50 %. Los resultados que se obtienen se detallan en la figura 2.27.

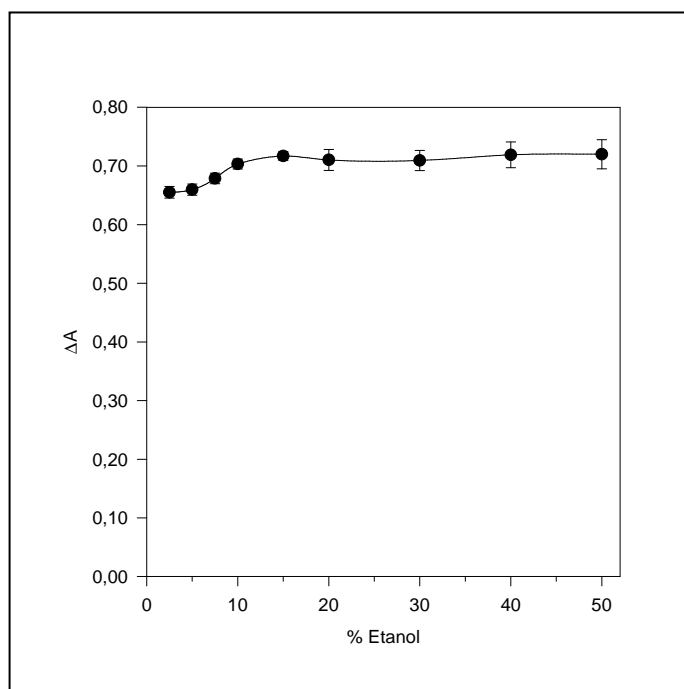


Figura 2.27. Efecto del contenido en etanol. $[\text{Zn(II)}] = 1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$; $[\text{dPKBH}] = 3,25 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$; $[\text{KH}_2\text{PO}_4] = 5,0 \cdot 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$; pH = 6,4.

Como se puede observar, para contenidos bajos en el porcentaje de etanol (<20%) se obtiene una excelente reproducibilidad en las medidas, mientras que a valores superiores a 20% se pierde precisión debido a la aparición de turbidez en las

Desarrollo, optimización y validación de nuevos métodos analíticos

muestras. Además, a medida que aumenta el porcentaje de etanol se observa un incremento de la señal analítica de hasta un 15%, que se mantiene constante hasta el 50% de etanol.

Por tanto, para obtener la formación del complejo en condiciones adecuadas y las medidas con mayor precisión se tomó como óptimo un porcentaje final de etanol de 15% v/v.

Orden de adición de reactivos

Para ello, se preparan varias disoluciones conteniendo $1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} \text{ Zn(II)}$, y sus correspondientes blancos, en las condiciones experimentales anteriormente seleccionadas como óptimas, variando el orden de adición de los reactivos como se muestra en la tabla 2.12.

Tabla 2.12. Efecto del orden de adición de reactivos.

Orden de adición	ΔA
Zn-tampón-dPKBH-etanol	$0,701 \pm 0,001$
Zn-tampón-etanol-dPKBH	$0,700 \pm 0,001$
Zn-etanol-dPKBH-tampón	$0,694 \pm 0,001$
Zn-dPKBH-etanol-tampón	$0,691 \pm 0,001$

De los valores de absorbancia que se detallan en la tabla, se comprueba que son prácticamente independientes del orden de adición de los reactivos. No obstante, el orden elegido para la formación del complejo fue el primero, ya que es probablemente el más adecuado cuando se trate de aplicar el método a muestras reales.

Estequiometría del complejo

Se han aplicado dos métodos diferentes para establecer la estequiometría del mismo: el método de Job o de las variaciones continuas y el método de la razón molar. Ambos métodos ya han sido explicados anteriormente. En la figura 2.28 se muestran los resultados obtenidos mediante el método de Job, y en la misma se observa que en el punto de corte de ambas rectas la fracción molar para el cinc es $X_{\text{Zn(II)}} = 0,33$. Estos

CAPÍTULO 2

resultados sugieren una relación molar Zn(II):dPKBH 1:2, la misma que ya se había obtenido anteriormente para el complejo formado por el reactivo y Cu(II). Este hecho pone de manifiesto la afinidad del reactivo por cationes divalentes, indicando además, que el dPKBH actúa como un ligando bidentado.

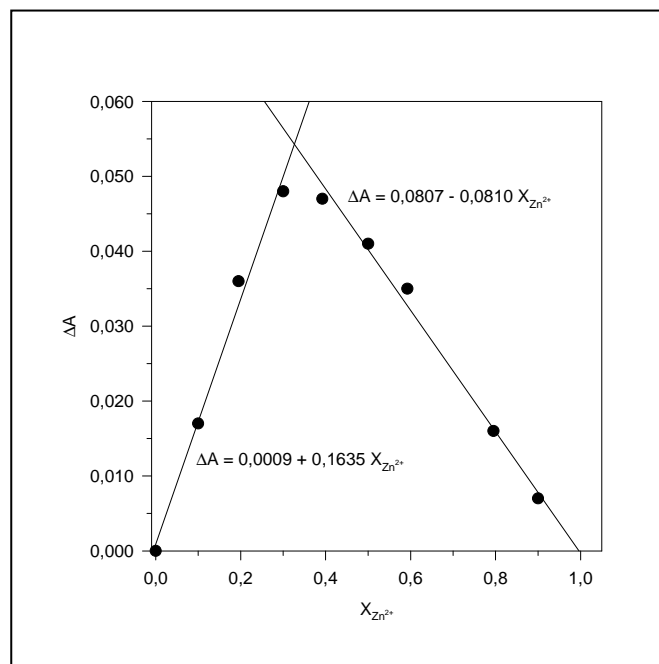


Figura 2.28. Estequiometría del complejo Zn(II)-dPKBH mediante el método de Job o de las variaciones continuas.

El método de la razón molar se muestra en la figura 2.29. Igual que en el caso anterior, se pueden extrapolar dos líneas rectas cuyo punto de corte coincide con la relación de moles entre el reactivo y el catión, que es 2,24. Este resultado es coherente con el obtenido por el método de Job.

Por tanto, y del mismo modo que ocurriría para el cobre, el enlace formado por el átomo de cinc con cada molécula de reactivo debe ocurrir probablemente como consecuencia de la desprotonación de cada grupo CONH del reactivo. Así, en la figura 2.30 se propone la estructura para el complejo Zn(II)-dPKBH en disolución.

Desarrollo, optimización y validación de nuevos métodos analíticos

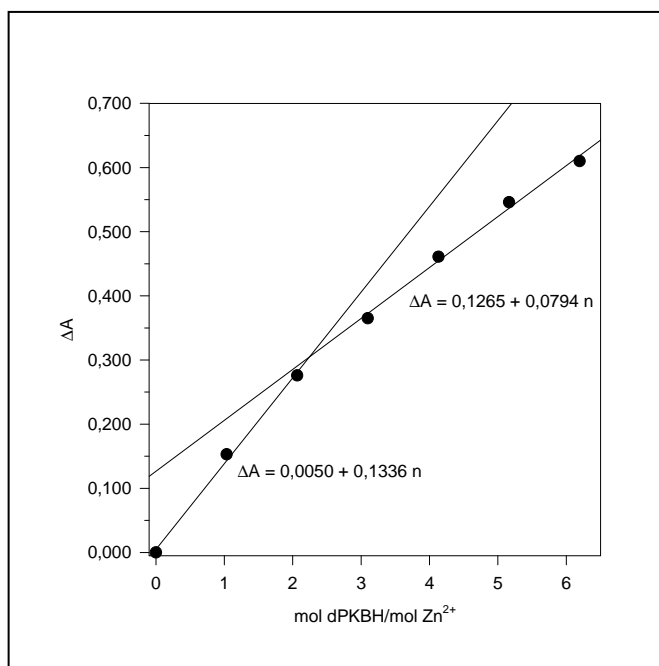


Figura 2.29. Estequiometría del complejo Zn(II)-dPKBH mediante el método de la Razón Molar.

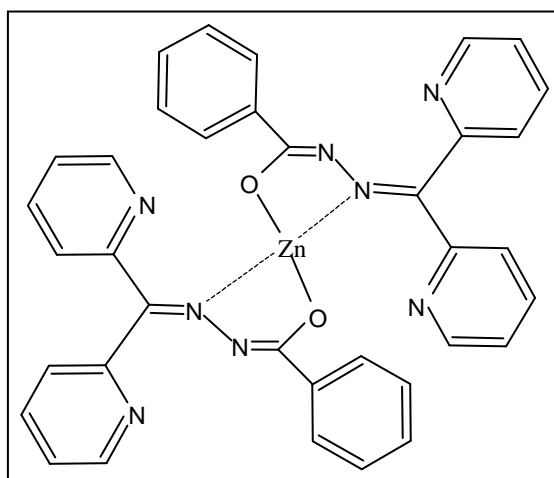


Figura 2.30. Estructura propuesta para el complejo Zn(II)-dPKBH.

Estabilidad del complejo

Para realizar este estudio ya se partía con la información previamente obtenida en la optimización del pH del sistema. En ésta, se había comprobado cómo la formación del complejo tenía lugar inmediatamente después de mezclar todos los reactivos y,

CAPÍTULO 2

además, que la absorbancia permanecía constante durante, al menos, 10 minutos. No obstante, parecía adecuado disponer de la información relativa al tiempo máximo en el que podría efectuarse la medida de las disoluciones sin disminución de la señal. Para ello, se prepara una disolución del complejo Zn(II)-dPKBH en las condiciones previamente descritas y se realizan las medidas de absorbancia a 370 nm en función del tiempo, frente a su blanco correspondiente.

En la figura 2.31 se exponen los resultados que se alcanzan y, como se puede observar, la absorbancia permanece estable durante al menos 1 hora, momento a partir del cual se produce un descenso progresivo de la misma. Así, transcurridos 90 minutos, la pérdida de la señal analítica era aproximadamente de un 10% respecto del valor inicial.

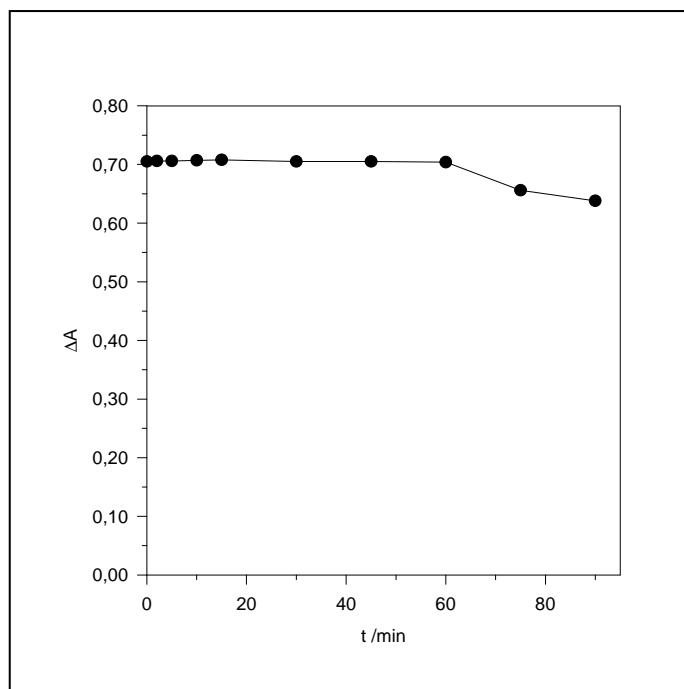


Figura 2.31. Estabilidad del complejo Zn(II)-dPKBH.
[Zn(II)] = 1 mg·L⁻¹; [dPKBH] = 3,25·10⁻⁴ mol·L⁻¹; [KH₂PO₄] = 5,0·10⁻³ mol·L⁻¹; 15% v/v etanol; pH = 6,4.

Estos resultados ponen de manifiesto que la estabilidad del sistema, aunque no es muy alta, es suficiente para que el tiempo que se dispone para efectuar los análisis en el laboratorio sea adecuado para el estudio cuantitativo del cinc. Además, si se considera que el método aquí desarrollado se plantea como una nueva alternativa de

Desarrollo, optimización y validación de nuevos métodos analíticos

metodología analítica para aplicar por medio de un control *on line*, éste no será un factor limitante, ya que en estos casos las medidas se realizan en el mismo instante en el que se recogen las muestras.

3.2.3. Validación del método

Una vez que se estudiaron y optimizaron todas las variables químicas que afectaban al sistema de medida, se procede al análisis de aquellas características analíticas que permiten validar la nueva metodología desarrollada.

Intervalo de linealidad

En la figura 2.32 se muestran los resultados obtenidos entre 0 y 6 mg·L⁻¹ de Zn(II), observándose un comportamiento lineal para su concentración hasta 3 mg·L⁻¹. Para confirmarlo se determina la diferencia, expresada como porcentaje de variación, entre el valor experimental y el proporcionado por la recta de regresión. De este modo, para 3 mg·L⁻¹ Zn(II) se obtiene -1,3% mientras que es de -9,7% para 4 mg·L⁻¹ Zn(II).

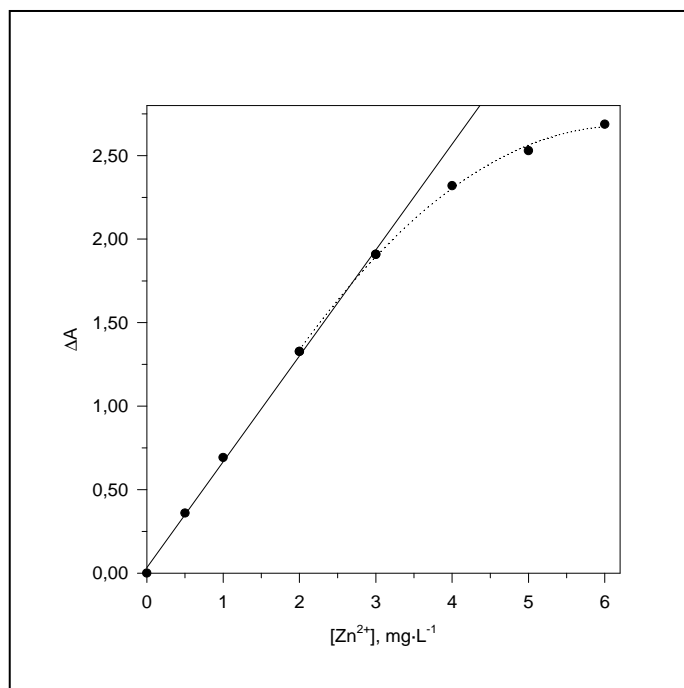


Figura 2.32. Intervalo de linealidad para Zn(II). [dPKBH] = $3,25 \cdot 10^{-4}$ mol·L⁻¹; [H₂PO₄⁻] = $5,0 \cdot 10^{-3}$ mol·L⁻¹; 15% etanol. pH = 6,4. $\Delta A = A_{\text{complejo}} - A_{\text{blanco}}$.

CAPÍTULO 2

Utilizando los datos de la gráfica anterior en los que el comportamiento del sistema es lineal, se obtiene la siguiente ecuación de ajuste para altas concentraciones de Zn(II):

$$A = 0,6336 (\pm 0,0422) [\text{Zn(II)}] + 0,032 (\pm 0,071) \quad r^2 = 0,999$$

En ésta, se indican entre paréntesis los intervalos de confianza obtenidos para la pendiente y la ordenada en el origen. Éstos se calcularon como ts_a y ts_b , siendo s_a y s_b las desviaciones estándar relativas para la pendiente y la ordenada en el origen, respectivamente, y t es el parámetro de la distribución de Student para $n-2$ grados de libertad al 95% de confianza ($p = 0,05$).

Absortividad molar

Para obtener el valor de este parámetro se estudiaron cuatro intervalos de concentración de Zn(II) diferentes: 0 a 3 mg·L⁻¹; 0 a 2 mg·L⁻¹; 0 a 0,1 mg·L⁻¹ y 0 a 0,01 mg·L⁻¹, respectivamente. Tras mezclar todos los reactivos, se realizan las medidas a 370 nm y posteriormente se calculan las correspondientes rectas de regresión. Dado que las medidas se realizaron en todo momento empleando una cubeta de cuarzo de 1 cm de paso de luz, las pendientes de las rectas de regresión coincidían con el valor de absortividad molar del método. En esta ocasión, el valor que se obtuvo fue:

$$\epsilon = 4,22(\pm 0,16) \cdot 10^4 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$$

Límites de detección y cuantificación

Para ello, y considerando los bajos niveles de concentración en los que puede encontrarse el analito en las muestras acuosas naturales, se construyeron diversas rectas de calibrado en las que se iba reduciendo el intervalo de concentración de cinc. Cada una de ellas estaba formada por cinco puntos, obtenidos cada uno de ellos como el valor medio de nueve determinaciones.

Desarrollo, optimización y validación de nuevos métodos analíticos

En la figura 2.33 se muestra, a modo de ejemplo, la recta de regresión obtenida para el intervalo de concentraciones más bajo estudiado. De nuevo, las líneas verticales indican la desviación estándar de cada una de las medidas.

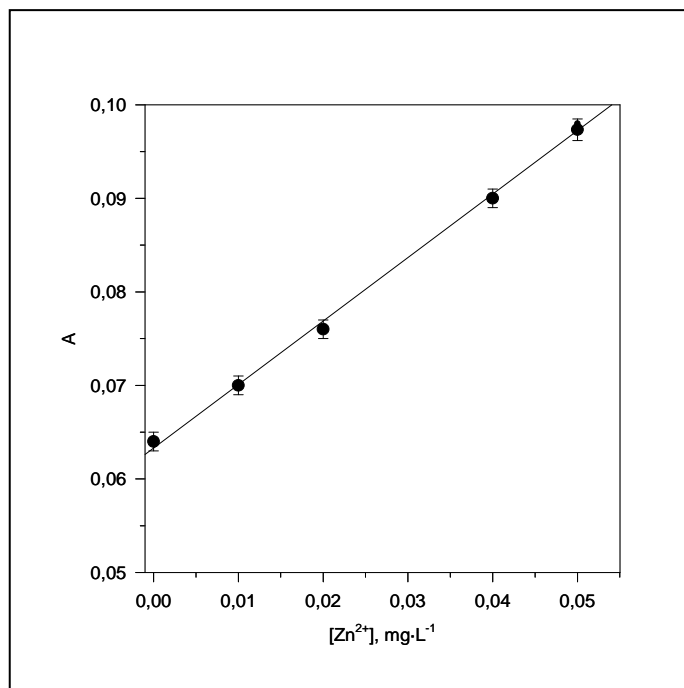


Figura 2.33. Recta de regresión para trazas de cinc.

En la tabla 2.13 se muestran los parámetros de ajuste obtenidos para las diferentes rectas de regresión, indicándose en la última columna los límites de detección para cada intervalo, utilizándose para calcularlos el criterio del cociente entre tres veces la desviación estándar de la ordenada en el origen y la pendiente de la recta. De este modo, se puede observar que utilizando el intervalo de concentraciones más bajo, el límite de detección del método es:

$$\boxed{\text{L.D.} = 1,9 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}}$$

Este valor de límite de detección indica que el método espectrofotométrico desarrollado proporciona una sensibilidad del mismo orden de magnitud que algunos métodos atómicos e incluso es mejor que la práctica totalidad de métodos espectrofotométricos ya descritos en la introducción de la presente memoria.

CAPÍTULO 2

Tabla 2.13. Intervalos de concentración empleados para calcular el límite de detección.

Intervalo (mg·L ⁻¹)	Ordenada en el origen	Pendiente	r ²	^a s _a	^a s _b	L.D. (mg·L ⁻¹)
0 – 0,5	0,0643	0,6404	0,9999	0,8·10 ⁻³	0,0033	3,8·10 ⁻³
0 – 0,2	0,0675	0,6269	0,9972	2,0·10 ⁻³	0,0192	9,5·10 ⁻³
0 – 0,1	0,0698	0,6150	0,9920	1,2·10 ⁻³	0,0246	5,6·10 ⁻³
0 – 0,05	0,0634	0,6471	0,9974	0,4·10 ⁻³	0,0156	1,9·10 ⁻³

^as_a y s_b son las desviaciones estándar de la ordenada en el origen y la pendiente, respectivamente.

Por otra parte, el límite de cuantificación, calculado como el cociente entre diez veces la desviación estándar del blanco y la pendiente de la recta de regresión, resultó ser:

$$\text{L.C.} = 6,2 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$$

Precisión

Para establecer la *repetibilidad*, se prepararon once disoluciones que contenían 1 mg·L⁻¹ Zn(II) y los distintos reactivos en las condiciones óptimas y se midieron frente a su blanco correspondiente. Como puede observarse en la figura 2.34, los resultados alcanzados indican una adecuada repetibilidad de las medidas, proporcionando un valor de:

$$\text{R.S.D.} = 1,37\%$$

Para evaluar la *reproducibilidad*, se compararon los resultados obtenidos tras el análisis de once disoluciones que contenían 1 mg·L⁻¹ Zn(II) y todos los reactivos en las condiciones optimizadas, en días diferentes. En esta ocasión, los resultados indicaron una excelente reproducibilidad:

$$\text{R.S.D.} = 1,38\%$$

Por tanto, a partir de los valores obtenidos para la repetibilidad y la

Desarrollo, optimización y validación de nuevos métodos analíticos

reproducibilidad se puede concluir que el método desarrollado proporciona una buena precisión en las medidas.

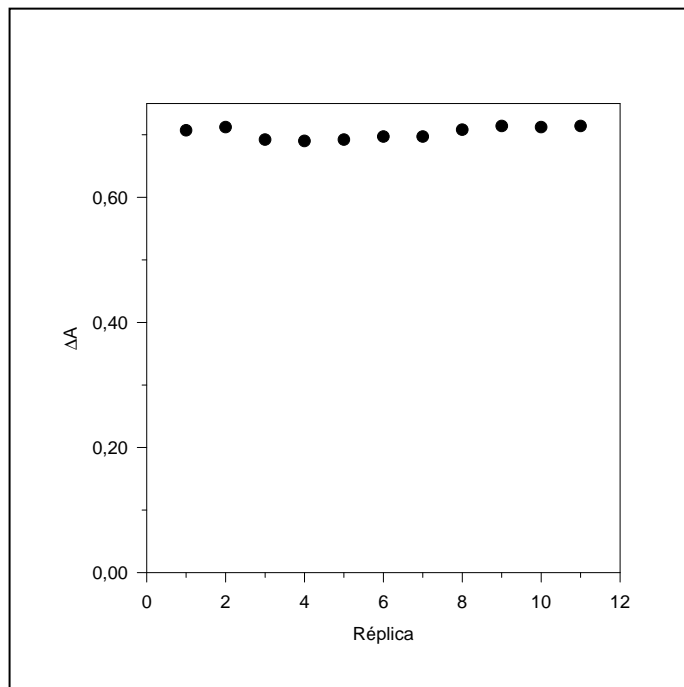


Figura 2.34. Precisión del método. $[dPKBH] = 3,25 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$; $[\text{H}_2\text{PO}_4^-] = 5,0 \cdot 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$; 15% etanol. $[\text{Zn(II)}] = 1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$; pH = 6,4.

Estudio de Interferencias

Para ello, se observa la variación que experimenta la absorbancia de una disolución que contiene $50 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ de Zn(II) tras la adición del posible ión interferente.

En esta ocasión, hay que señalar que ya se partía con la información previamente obtenida cuando se estudiaron las interferencias para el complejo de Cu(II) (véase tabla 2.7). Por tanto, considerando que en la mayoría de las medidas espectrofotométricas la aparición de interferencias surgen como consecuencia de reacciones competitivas entre el ligando y la especie potencialmente interferente, cabía esperar que el comportamiento del sistema fuera similar al observado en el caso del cobre. En este sentido, parecía lógico esperar que la adición de los diferentes aniones a la disolución que contenía el cinc condujera a resultados similares a los que se obtuvieron para el cobre. Así, el estudio de éstos se efectuó comprobando su potencial interferencia en las relaciones molares con cinc más elevadas, esto es, 1:20.000. Para el caso de los cationes se empleó

CAPÍTULO 2

el mismo razonamiento, estudiándose tan sólo aquellos que habían presentado los efectos más importantes.

Aniones

Como se ha mencionado anteriormente, se utilizaron sales sódicas, potásicas y amónicas en todos los casos en los que fue posible. Para efectuar los ensayos correspondientes se prepararon disoluciones concentradas en cada anión. A partir de ellas, mediante dilución, se prepararon las disoluciones adecuadas para obtener las relaciones molares entre metal y especie interferente.

Haluros y Perclorato. En la tabla 2.14 se indican las distintas disoluciones que se emplearon para llevar a cabo este estudio. Teniendo en cuenta que ninguno de ellos presenta interferencia en la determinación de cobre por medio de su complejo con dPKBH en la relación molar más alta estudiada, se comenzó inicialmente comprobando el efecto que provocaba en la absorbancia del complejo Zn(II)-dPKBH su adición en relación molar 1:20.000. En dicha tabla se muestran los resultados que se obtienen, indicándose en cada columna la absorbancia de la disolución utilizada como control, la de la disolución tras añadir la posible especie interferente y el porcentaje de variación de la misma, respectivamente. Como se puede observar, en ningún caso se supera el límite establecido, esto es, el 5% de variación, por lo que se constata que la adición de las sales estudiadas pueden tolerarse en el método espectrofotométrico del Zn(II)-dPKBH.

Tabla 2.14. Efecto de la adición de haluros y perclorato en la absorbancia del complejo Zn(II)-dPKBH.

Zn(II)-dPKBH (A)	Sal añadida	Zn(II)-dPKBH + Sal (A)	ΔA (%)
0,032	NaCl	0,032	0,0
	KCl	0,033	3,1
	NH ₄ Cl	0,033	3,1
	KBr	0,033	3,1
	NH ₄ F	0,033	3,1
	KI	0,033	3,1
	NaClO ₄	0,032	0,0

Desarrollo, optimización y validación de nuevos métodos analíticos

Nitratos y nitritos. En esta ocasión la relación más alta que se ha utilizado para nitritos es 1:1.000. Las sales utilizadas así como los resultados que se obtienen, mostrados en la tabla 2.15, ponen de manifiesto la ausencia de interferencias de estas especies en las relaciones molares estudiadas.

Tabla 2.15. Efecto de la adición de nitratos y nitritos en la absorbancia del complejo Zn(II)-dPKBH.

Zn(II)-dPKBH (A)	Sal añadida	Zn(II)-dPKBH + Sal (A)	ΔA (%)
0,033	NaNO ₃	0,034	3,0
	NH ₄ NO ₃	0,033	0,0
	NaNO ₂	0,034	3,0

Sulfato y tiosulfato. Del mismo modo que en los casos precedentes, se prepararon las disoluciones del blanco, de control (cuya concentración final en Zn(II) era 50 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) y con los posibles interferentes. Los resultados que se alcanzan se detallan en la tabla 2.16 e indican que la presencia de sulfatos y tiosulfatos en relación molar 1:20.000 no producen interferencias en la medida.

Tabla 2.16. Efecto de la adición de sulfato y tiosulfato en la absorbancia del complejo Zn(II)-dPKBH.

Zn(II)-dPKBH (A)	Sal añadida	Zn(II)-dPKBH + Sal (A)	ΔA (%)
0,033	Na ₂ SO ₄	0,034	3,0
	Na ₂ S ₂ O ₃ ·5H ₂ O	0,034	3,0

Acetato, oxalato, citrato y tartrato. Para estos iones se preparan las disoluciones en las diferentes relaciones molares a partir de las sales que se muestran en la tabla 2.17. Se adicionaron acetato y oxalato en relación molar 1:20.000 así como 1:1.000 para citrato y 1:5.000 para tartrato. Como se puede observar, la adición de acetato y oxalato no produce variación en la absorbancia. En el caso de los otros dos aniones estudiados no se observó este mismo comportamiento. Así, la adición de citrato produce una pequeña interferencia negativa, mientras que la adición de tartrato presenta una leve interferencia a partir de la relación molar 1:5.000.

CAPÍTULO 2

El hecho de que la adición de citrato a la disolución utilizada como control provocara un leve descenso de su absorbancia coincide con los resultados previamente obtenidos en el estudio de cobre, ya que éste se utilizaba como enmascarante en su determinación, y en el otro caso es probablemente debido a la interacción del antimonio con el reactivo quelatante.

Tabla 2.17. Efecto de la adición de acetato, oxalato, citrato y tartrato en la absorbancia del complejo Zn(II)-dPKBH.

Zn(II)-dPKBH (A)	Sal añadida	Zn(II)-dPKBH + Sal (A)	ΔA (%)
0,033	NaCH ₃ COO	0,033	0
	(NH ₄) ₂ C ₂ O ₄ ·H ₂ O	0,033	0
	Na ₃ C ₆ H ₅ O ₇ ·2H ₂ O	0,030	- 9,1
	KSbC ₄ H ₄ O ₇ ·½H ₂ O	0,035	6,1

Cationes

Como ya se ha indicado anteriormente, tan sólo se han estudiado las posibles interferencias causadas por aquellas especies catiónicas que presentan los mayores efectos en la medida del complejo de cobre, (véase tabla 2.8). En este sentido, se ha comenzado el estudio ensayando en primer lugar las relaciones molares catión:cinc a las que los primeros ya habían presentado interferencias en la medida de cobre. A continuación, y en función de los resultados obtenidos, se ha variado dicha relación para determinar el límite de tolerancia para cada uno de los metales ensayados. Para cada uno de ellos se dispone de disoluciones patrones de 1 g·L⁻¹ del catión correspondiente, a partir de las cuales se efectúan las diluciones adecuadas para tener en la disolución final las relaciones molares oportunas.

Debido a que en el estudio de las interferencias aniónicas se han empleado sales sódicas, potásicas o amónicas, la información obtenida también es aplicable a estos cationes. Los resultados extrapolados se detallan en la tabla 2.18. Éstos se calculan como la media de los valores de absorbancia que presentan en cada una de las sales en las que se encontraban presentes en el estudio de los aniones. Como puede deducirse, la adición de éstos no afecta a la medida hasta la relación molar más alta estudiada, esto es, 1:20.000.

Desarrollo, optimización y validación de nuevos métodos analíticos

Tabla 2.18. Efecto de la adición de sodio, potasio y amonio en la absorbancia del complejo Zn(II)-dPKBH.

Zn(II)-dPKBH (A)	Catión	Zn(II)-dPKBH + Catión (A)	ΔA (%)
0,033	Na ⁺	0,034	3,0
	K ⁺	0,033	0
	NH ₄ ⁺	0,033	0

Para el resto de metales ensayados, los resultados se presentan en función de su pertenencia a los distintos grupos principales del sistema periódico o a las diferentes series de transición, como se expone en la tabla 2.19.

Tabla 2.19. Cationes ensayados como posibles interferentes.

Grupo	Cationes
13	Al(III)
14	Sn(II), Pb(II)
1ª Serie transición	Cr(III), Mn(II), Cu(II), Fe(III), Fe(II), Co(II), Ni(II)
2ª Serie transición	Cd(II)

Elementos de los grupos 13-14. Del mismo modo que en los casos precedentes, se ha utilizado como control una disolución que contenía $50 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ Zn(II). Se han preparado disoluciones en las que las relaciones molares respecto de Zn(II) fueron 20:1, 10:1 y 5:1, para Sn(II), Al(III) y Pb(II), respectivamente. Los resultados que se obtienen indican que, para dichas relaciones molares, los cationes estudiados provocan interferencias. Por tanto, se ensayan relaciones molares más bajas para evaluar el límite de tolerancia para cada catión. Así, en la tabla 2.20 se presentan los resultados obtenidos para las relaciones molares catión:cinc a las que éstos no provocan interferencias.

CAPÍTULO 2

Tabla 2.20. Límites de tolerancia de los cationes ensayados para la determinación de Zn(II).

Zn(II)-dPKBH (A)	Catión	Zn(II)-dPKBH + Catión (A)	ΔA (%)	Relación
0,033	Sn(II)	0,032	-3,0	2:1
	Al(III)	0,032	-3,0	1:1
	Pb(II)	0,034	3,0	1:1

Elementos de la 1ª y 2ª Series de Transición. En esta ocasión, y teniendo como referencia la información obtenida en el apartado anterior, la relación molar más alta estudiada para todos los cationes respecto de Zn(II) fue 1:1. Así, en la tabla 2.21 figuran los resultados que se obtienen. Como puede observarse, los cationes Fe(II), Co(II), Ni(II) y Cu(II) presentan las interferencias más importantes, provocando aumentos en la absorbancia de las disoluciones superiores al 70%. Por otra parte, los cationes Cd(II) y Fe(III) provocan un pequeño aumento de la absorbancia, lo que conduce a porcentajes de variación ligeramente superiores a los previamente establecidos, mientras que Cr(III) y Mn(II) no producen interferencias.

Tabla 2.21. Interferencias causadas por los elementos de las 1ª y 2ª series de transición.

Zn(II)-dPKBH (A)	Catión	Zn(II)-dPKBH + Catión (A)	ΔA (%)
0,034	Cu(II)	0,062	82,4
	Ni(II)	0,061	79,4
	Co(II)	0,060	76,5
	Fe(II)	0,059	73,5
	Cd(II)	0,039	14,7
	Fe(III)	0,037	8,8
	Mn(II)	0,033	-2,9
	Cr(III)	0,033	-2,9

A la vista de los resultados obtenidos, el estudio se continuó para determinar el nivel de tolerancia del método para los cuatro metales que producían los efectos más importantes: Cu(II), Ni(II), Co(II) y Fe(II). En este sentido, se preparan distintas disoluciones en las que se reduce progresivamente la relación molar entre el catión

Desarrollo, optimización y validación de nuevos métodos analíticos

interferente y el cinc. Así, en la tabla 2.22 se detallan, a modo de ejemplo, los valores de absorbancia y el porcentaje de variación de ésta que se alcanzan para las diferentes relaciones molares estudiadas entre cobre y cinc. Como se puede observar, a medida que disminuye la relación molar entre ambos cationes, esto es, la concentración de Cu(II) en la disolución es menor, más bajo es el porcentaje de variación, obteniéndose que para una relación molar 0,02:1 (Cu(II):Zn(II)) dicho catión deja de afectar a las medidas. Para los otros tres cationes se sigue el mismo procedimiento, mostrando los resultados límites de tolerancia ligeramente superiores a los de cobre. Así, para Ni(II) y Co(II) se obtuvieron porcentajes de variación de la absorbancia de 0,2% y 3,1%, respectivamente, para una relación molar 0,04:1 (M(II):Zn(II)). En el caso de Fe(II) ésta fue 0,08:1 (Fe(II):Zn(II)), con un porcentaje de variación para la absorbancia de la mezcla de 1,4%.

Tabla 2.22. Límite de tolerancia del método para Cu(II).

Zn(II)-dPKBH (A)	Cu(II):Zn(II) (M)	Zn(II)-dPKBH + Cu(II) (A)	ΔA (%)
0,031	1:1	0,056	82,4
	0,5:1	0,046	48,4
	0,25:1	0,041	32,2
	0,08:1	0,035	12,9
	0,02:1	0,030	-3,2

De estos resultados, se pueden establecer las siguientes conclusiones:

- La mayoría de los aniones ensayados, así como los cationes Na^+ , K^+ y NH_4^+ , no producen interferencias en la medida de la disolución en relativamente muy altas concentraciones.
- Para aquellos cationes cuyos estados de oxidación son distintos de dos (Fe(III), Cr(III) y Al(III)), se obtienen mayores límites de tolerancia.
- Los elementos de las distintas series de transición cuyo estado de oxidación predominante es dos son los que presentan las mayores interferencias incluso a niveles de concentración inferiores a los de cinc, como es el caso de Cu(II), Ni(II), Fe(II) y

CAPÍTULO 2

Co(II). Lo cual es probablemente debido a una competencia entre el ión interferente, el cinc y el ligando quelatante, que hace que la interacción ión metálico-ligando es superior a la de Zn-ligando y produciendo además un complejo coloreado.

Estudio de Enmascarantes

En el estudio precedente se ha mostrado que existen una serie de elementos cuya presencia, incluso a niveles de concentración inferiores a los que se encuentra el cinc, pueden producir interferencias en la medida. Por tanto, se hace necesaria la búsqueda de posibles reacciones de enmascaramiento para estas especies interferentes.

En este sentido, de los posibles agentes enmascarantes encontrados en la bibliografía, se ensayaron el tiosulfato sódico y la dimetilglioxima. Como se indica en la tabla 2.16, el ión tiosulfato no causa interferencias en las medidas de cinc en relaciones molares con éste de hasta 20.000. Para la dimetilglioxima se ha procedido del mismo modo que en el estudio de interferencias, llegándose previamente a corroborar la ausencia de interferencia en relación 20.000:1 respecto del analito. Así, para el tiosulfato sódico se prepara diariamente una disolución acuosa al 10% p/v (equivalente a una concentración 0,4 M), mientras que para la dimetilglioxima se prepara una disolución etanólica de 1 g·L⁻¹.

Para evaluar la efectividad de los mismos se prepara una muestra sintética que contiene la totalidad de los cationes estudiados en el apartado anterior y cuya composición se muestra en la tabla 2.23. Además, se utiliza otra disolución que contiene 70 µg·L⁻¹ Zn(II) y todos los reactivos necesarios en las condiciones óptimas, midiéndose a 370 nm frente al blanco correspondiente, que se toma como referencia.

Tabla 2.23. Composición de la muestra sintética.

Catión	[M ⁿ⁺], µg·L ⁻¹	Catión	[M ⁿ⁺], µg·L ⁻¹
Al(III)	128	Cd(II)	8
Cr(III)	20	Co(II)	24
Fe(III)	92	Pb(II)	20
Mn(II)	36	Ni(II)	60
Cu(II)	20	Zn(II)	72

Desarrollo, optimización y validación de nuevos métodos analíticos

Así pues, de la muestra de referencia previamente preparada se toman alícuotas que se miden empleando el método desarrollado, obteniendo de este modo una medida de la absorbancia en ausencia de enmascarantes. Posteriormente, se realiza el mismo proceso a diferentes alícuotas, pero añadiendo además el posible agente enmascarante en diferentes concentraciones. Los valores de absorbancia obtenidos se comparan con el de la muestra de referencia sin enmascarante así como con el de la disolución que contiene tan sólo los $70 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ Zn(II). De este modo se puede obtener mayor cantidad de información, ya que por una parte se comprueba la eficacia del enmascarante a medida que aumenta su concentración en la muestra de referencia y, por otra, de la comparación con la absorbancia de la disolución que tan sólo contiene el analito se puede comprobar si el enmascarante ha alcanzado su máxima eficacia. Por último, se adicionaron ambos enmascarantes en las concentraciones en las que producían el mayor enmascaramiento para comprobar su funcionamiento conjunto. En las figuras 2.35 y 2.36 se presentan los efectos provocados sobre la muestra de referencia la adición de tiosulfato sódico y dimetilglioxima por separado. En éstas, se representa en color verde la absorbancia de la disolución que contenía sólo $70 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ Zn(II), en color azul la muestra de referencia sin enmascarante y en color rojo la absorbancia de la muestra de referencia y el enmascarante adicionado. Como se puede observar en la figura 2.35, la adición de tiosulfato sódico produce un descenso progresivo de las interferencias a medida que aumenta su concentración. Así, comparando con la disolución de $70 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ Zn(II), las interferencias se reducen desde el 92% (muestra de referencia sin tiosulfato) hasta un 32% para una concentración final 0,08 M de tiosulfato en el matraz. Cuando se utilizan concentraciones de enmascarante más elevadas no se obtienen mejoras significativas.

CAPÍTULO 2

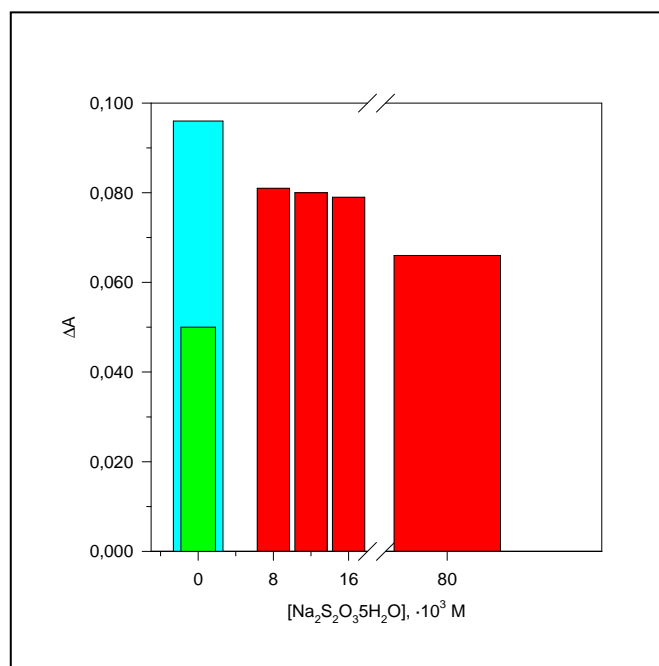


Figura 2.35. Efecto de la adición de tiosulfato sódico como agente enmascarante.

En el caso de la dimetilglioxima, cuyos resultados se muestran en la figura 2.36, el descenso observado osciló desde el 92% (muestra sintética sin dimetilglioxima) hasta un 26% para una concentración final de 40 mg·L⁻¹ de dimetilglioxima en el matraz. Estos resultados ponen de manifiesto la adecuación de ambos para reducir las interferencias, no obstante, aún en las concentraciones más elevadas no se consiguen eliminar completamente.

Por último, se comprobó el efecto que produce la adición de ambos enmascarantes. Los resultados que se alcanzaron, y que se detallan en la tabla 2.24 para las distintas mezclas de enmascarantes utilizadas, indican que la adición de tiosulfato sódico en una concentración final 8·10⁻³ M y 40 mg·L⁻¹ de dimetilglioxima es adecuada para cuantificar el analito sin que afecten las interferencias. Por tanto, para cuantificar la concentración de cinc en muestras reales será necesario adicionar tiosulfato sódico y dimetilglioxima de forma que sus concentraciones finales en el matraz sean 8·10⁻³ M y 40 mg·L⁻¹, respectivamente.

Desarrollo, optimización y validación de nuevos métodos analíticos

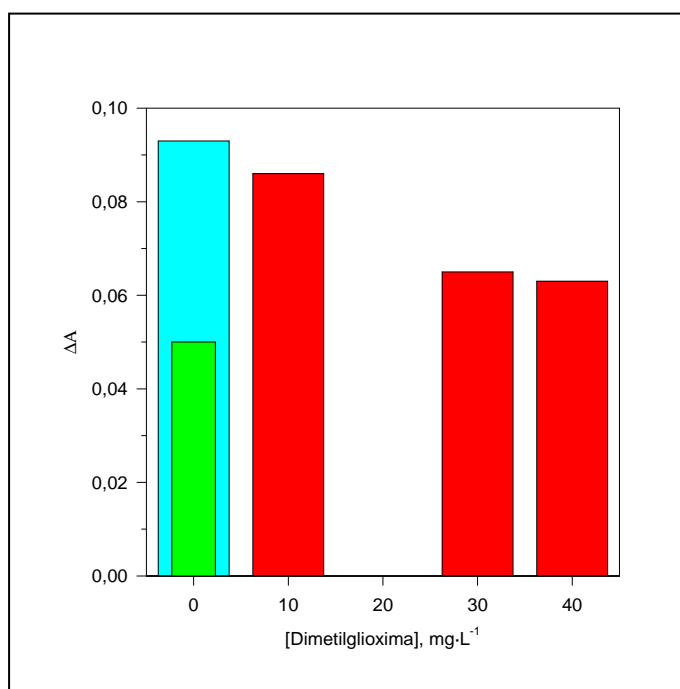


Figura 2.36. Efecto de la adición de dimetilgloxima como agente enmascarante.

Tabla 2.24. Eficacia de la mezcla de ambos enmascarantes.

M. control ^a (A)	Tiosulfato (M)+ DMG ^b (mg·L ⁻¹)	Muestra + enm. ^c (A)	%ΔA
0,050	----	0,093	86,0
	$8 \cdot 10^{-3} + 30$	0,054	8,0
	$8 \cdot 10^{-3} + 40$	0,048	-4,0
	$8 \cdot 10^{-3} + 50$	0,048	-4,0
	$12 \cdot 10^{-3} + 40$	0,048	-4,0

a: Disolución de $70 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ Zn(II). **b:** Dimetilgloxima. **c:** Mezcla de enmascarantes.

Exactitud

En esta ocasión, se han utilizado dos materiales de referencia certificados, el primero de ellos es una muestra de agua potable blanda (LGC 6011) suministrada por el “Laboratory of the Government Chemist” (Reino Unido), mientras que el otro es una muestra de agua de río (SRM 1643d) suministrado por el “National Institute of Standards & Technology” (Estados Unidos). En las tablas 2.25 y 2.26 se indican las

CAPÍTULO 2

concentraciones de cada una de las especies presentes en LGC 6011 y SRM 1643d, respectivamente.

Tabla 2.25. Valores certificados para LGC 6011.

Metal	[M], $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$	Metal	[M], $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$	Metal	[M], $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$
Aluminio	218 ± 8	Níquel	51 ± 3	Calcio	28 ± 1
Bario	104 ± 5	Plata	$9,2 \pm 1,7$	Magnesio	$1,2 \pm 0,2$
Cromo	48 ± 2	Plomo	$50 \pm 1,8$	Potasio	$0,5 \pm 0,1$
Hierro	194 ± 8	Zinc	514 ± 25	Sodio	$4,5 \pm 0,2$
Manganeso	52 ± 3				

Tabla 2.26. Valores certificados para SRM 1643d.

Metal	[M], $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$	Metal	[M], $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$	Metal	[M], $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$
Aluminio	$127,6 \pm 3,5$	Hierro	$91,2 \pm 3,9$	Calcio	$31,04 \pm 0,50$
Antimonio	$54,1 \pm 1,1$	Litio	$16,50 \pm 0,55$	Magnesio	$7,989 \pm 0,035$
Arsénico	$56,02 \pm 0,73$	Manganeso	$37,66 \pm 0,83$	Potasio	$2,356 \pm 0,035$
Bario	$506,5 \pm 8,9$	Molibdeno	$112,9 \pm 1,7$	Sodio	$22,07 \pm 0,64$
Berilio	$12,53 \pm 0,28$	Níquel	$58,1 \pm 2,7$		
Boro	$144,8 \pm 5,2$	Plata	$1,270 \pm 0,057$		
Cadmio	$6,47 \pm 0,37$	Plomo	$18,15 \pm 0,64$		
Cobalto	$25,00 \pm 0,59$	Selenio	$11,43 \pm 0,17$		
Cobre	$20,5 \pm 3,8$	Talio	$7,28 \pm 0,25$		
Cromo	$18,53 \pm 0,20$	Vanadio	$35,1 \pm 1,4$		
Estroncio	$294,8 \pm 3,4$	Zinc	$72,48 \pm 0,65$		

Se han analizado por triplicado cada una de las muestras. En el caso de la muestra LGC 6011, ésta se diluye previamente (1:10). Los resultados que se obtienen se encuentran en la tabla 2.27. En ésta se muestran los valores de incertidumbre en la determinación, expresados en forma de desviación estándar, así como su exactitud, expresada como error relativo, (ϵ_r), y como porcentaje de recuperación (%R). En la última columna se detallan los valores obtenidos para el parámetro t de la distribución

Desarrollo, optimización y validación de nuevos métodos analíticos

de Student calculados para comparar los resultados experimentales con los valores de concentración certificados. Este parámetro adopta un valor de 4,30 para 2 grados de libertad y un nivel de probabilidad del 95%. Como se puede observar, los resultados obtenidos para ambas presentan errores relativos inferiores al 5%. Además, en ambos casos se calculan valores inferiores al tabulado, lo que indica que no existen diferencias estadísticamente significativas entre los resultados experimentales y los valores de referencia certificados.

Por último, los valores obtenidos para el porcentaje de recuperación indican que el método proporciona valores aceptables para ambas muestras, verificándose de este modo su exactitud.

Tabla 2.27. Resultados obtenidos en el análisis de las muestras de referencia.

Muestra	[Zn(II)] _{cert.} ($\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)	[Zn(II)] _{enc.} ($\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)	ε_r (%)	%R	t (95%)
LGC 6011	514 (± 25)	518 (± 10)	0,78	100,8	0,69
SRM 1643d	72,48 ($\pm 0,65$)	75,40 ($\pm 1,59$)	4,03	104,0	3,18

De los resultados obtenidos en este estudio de validación, podemos concluir que el método propuesto para la determinación de cinc en aguas naturales demuestra ser exacto, preciso, con un amplio intervalo de linealidad (hasta $3 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de Zn(II)), un límite de detección mejor que la gran mayoría de métodos espectrofotométricos y del mismo orden de magnitud que algunos métodos atómicos y selectivo cuando se emplean los agentes enmascarantes apropiados.

A continuación se indica el procedimiento a seguir para la determinación de cinc en aguas naturales utilizando el método propuesto:

A una alícuota de muestra que contenga entre 6,2 y 3.000 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ de Zn(II) se le añade, siguiendo el orden que se indica a continuación, la disolución reguladora de fosfatos (concentración final $5,0\cdot 10^{-3} \text{ M}$), la disolución de dPKBH (concentración final $3,25\cdot 10^{-4} \text{ M}$) y el volumen necesario de etanol para alcanzar un 15% v/v final. Para eliminar el efecto de posibles especies

CAPÍTULO 2

interferentes se adicionan también una disolución de tiosulfato sódico (concentración final $8 \cdot 10^{-3}$ M) y otra de dimetilglioxima (concentración final $40 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$) antes de la adición de los reactivos. Agitar suavemente para que se produzca la reacción de formación del complejo y medir la absorbancia a 370 nm. Calcular la concentración de analito en la muestra a partir de la gráfica de calibrado preparada a tal efecto.

3.2.4. Aplicación a muestras reales

Una vez validado el método, se ha procedido a su aplicación para la determinación de la concentración de cinc en muestras reales con matrices diferentes. La primera muestra analizada era agua potable tomada de los grifos del propio laboratorio. Ésta fue previamente analizada por espectroscopia de absorción atómica de llama para conocer el contenido, tanto de cinc, como de otros elementos que pudieran interferir en su cuantificación, encontrándose cantidades significativas de diversos elementos (Cu: $13,21 \text{ } \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$; Fe: $41,07 \text{ } \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$; Al: $146,66 \text{ } \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$; Mn: $2,56 \text{ } \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$). Después se ha analizado utilizando el método propuesto y añadiendo los agentes enmascarantes para obviar las posibles interferencias de las otras especies metálicas presentes. De este modo, los matraces que contenían las muestras presentaban una concentración final $8 \cdot 10^{-3}$ M de tiosulfato sódico y $40 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ de dimetilglioxima.

La concentración de cinc y otros elementos en la otra muestra acuosa, agua de río, se ha determinado también mediante FAAS. Se han encontrado concentraciones significativas de cobre ($542 \text{ } \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$), hierro ($604 \text{ } \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$) y plomo ($63,8 \text{ } \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$). Para llevar a cabo la determinación de cinc utilizando el método espectrofotométrico desarrollado, la muestra se diluye previamente (1:10) y se miden tres réplicas de la misma a las que también se les adicionan los enmascarantes.

En la tabla 2.28 se exponen los resultados que se obtienen tras el análisis de ambas muestras y, como puede observarse, los valores tanto de precisión como de exactitud obtenidos indican la adecuación del nuevo método propuesto para el análisis de cinc en niveles bajos de concentración. Además, los valores del estadístico t para la comparación de las medias experimentales son inferiores a los tabulados ($t = 2,78$ para $n = 4$ y $\alpha = 0,05$), por lo que de nuevo se pone de manifiesto la ausencia de diferencias

Desarrollo, optimización y validación de nuevos métodos analíticos

estadísticamente significativas entre las medias.

Tabla 2.28. Resultados obtenidos en el análisis de las muestras de referencia.

Muestra	[Zn(II)] _{certificada} ($\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)	[Zn(II)] _{encontrada} ($\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)	ε_r (%)	t (95%)
Agua potable	30,90 ($\pm 0,44$) ^a	31,21 ($\pm 0,87$)	1,00	0,55
Agua de río	590 (± 42) ^a	608 (± 17)	3,05	0,69

^a Concentración obtenida tras analizar por FAAS.

CAPÍTULO 2

3.3. MÉTODO SIMPLE Y EFECTIVO PARA LA DETERMINACIÓN DE VANADIO EN AGUAS NATURALES

3.3.1. Ensayos Preliminares

Para ello, inmediatamente después de mezclar todas las disoluciones se registran los espectros de absorción de los complejos V(IV)-dPKBH y V(V)-dPKBH frente a un blanco del reactivo preparado añadiendo la misma cantidad de dPKBH en etanol y disolución reguladora que en las disoluciones que contenían vanadio. De los espectros se desprende que la máxima absorbancia del complejo de V(IV) aparece a 374,4 nm mientras que lo hace a 395,2 nm para el de V(V). En adelante, los diferentes estudios de optimización de los sistemas se llevaron a cabo a dichas longitudes de onda. En la figura 2.37 se muestran los espectros de absorción de ambos complejos frente a su blanco correspondiente.

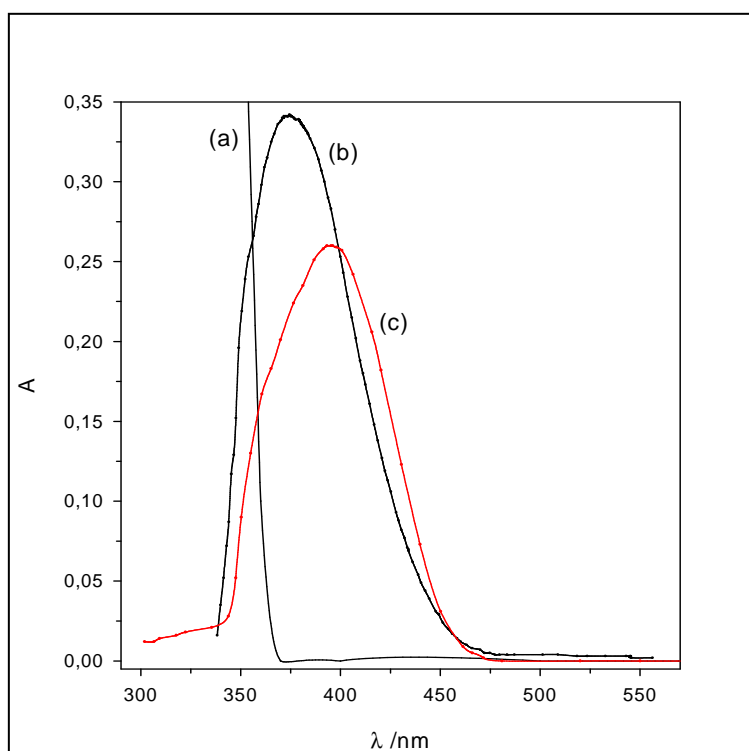


Figura 2.37. Espectros de absorción. (a) blanco del reactivo ($[dPKBH] = 3,25 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$; pH = 4,72; 10% etanol); (b) complejo V(IV)-dPKBH y (c) complejo V(V)-dPKBH ($[V(IV)] = [V(V)] = 1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$; $[dPKBH] = 3,25 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$; pH = 4,72; 10% etanol).

3.3.2. Optimización de las condiciones de formación de los complejos metálicos

Efecto del pH del medio

Para estudiar el efecto de esta variable en la absorbancia de ambos complejos se prepararon distintas disoluciones en matraces de 10 mL que contenían $1 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de V(IV) ó V(V), $3,25\cdot 10^{-4} \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ dPKBH y 10% de etanol. El pH de las mismas se varió del mismo modo que en los casos precedentes (complejos de cobre y de cinc). A continuación, se medían las absorbancias a 374,4 nm y 395,2 nm, para los complejos formados con V(IV) y V(V), respectivamente. Los resultados se detallan en la figura 2.38.

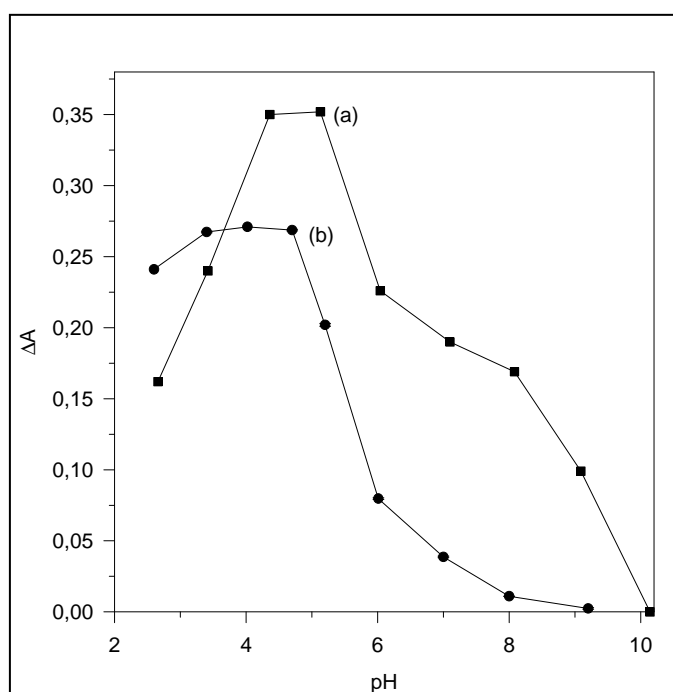


Figura 2.38. Efecto del pH. a) V(IV)-dPKBH y b) V(V)-dPKBH. $[\text{V(IV)}] = [\text{V(V)}] = 1 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$; $[\text{dPKBH}] = 3,25\cdot 10^{-4} \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$; 10% etanol. $\Delta A = A_{\text{complejo}} - A_{\text{blanco}}$.

En ésta se puede observar cómo existe un intervalo de pH, comprendido entre 4 y 5,5, en el cual la formación de ambos complejos tiene lugar en las condiciones más adecuadas. Así, se seleccionó pH 4,7 como el óptimo para el desarrollo de ambos complejos.

CAPÍTULO 2

Control del pH del medio

Los resultados mostrados anteriormente ponen de manifiesto la necesidad de realizar un control de la acidez del sistema de reacción para que la formación de ambos complejos tenga lugar adecuadamente. Además, en los ensayos preliminares ya se mostró que ambos complejos presentaban espectros muy definidos a pH 4,7. Por tanto, se seleccionó como disolución reguladora la formada por el sistema del ácido acético, cuyo valor de pK es de 4,75. En este sentido, su utilización en el intervalo de pH 4,5-5,5 estará controlada por el intercambio del protón del ácido acético. Posteriormente, se determinó la concentración óptima de dicha disolución para mantener el pH de la muestra en el valor deseado. Para ello, se prepararon distintas disoluciones en matraces de 10 mL que contenían $1 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de V(IV) ó V(V); $3,25\cdot 10^{-4} \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ de reactivo y 10% de etanol, así como sus correspondientes blancos, y se varió la concentración final de la disolución reguladora en cada una entre $4,0\cdot 10^{-3} \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ y $4,0\cdot 10^{-2} \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$. En la figura 2.39 se muestran los resultados que se obtuvieron.

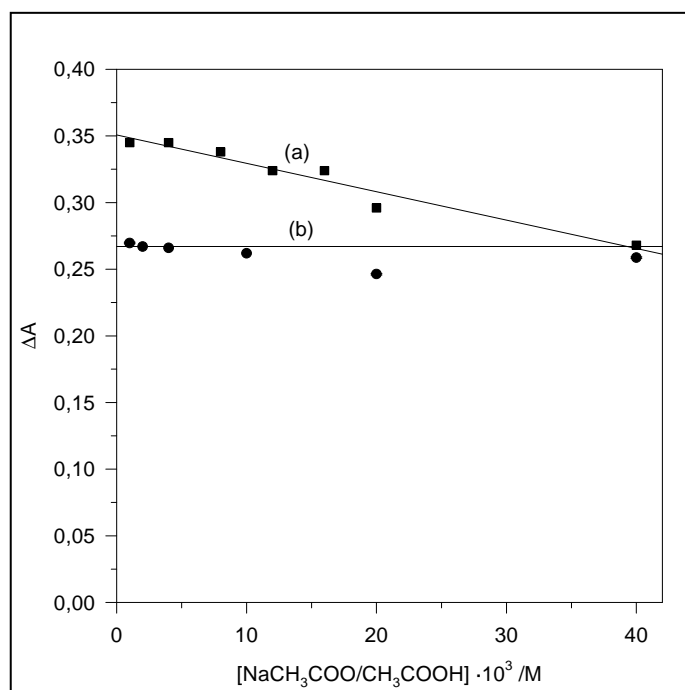


Figura 2.39. Efecto de la concentración de la disolución reguladora. a) V(IV)-dPKBH y b) V(V)-dPKBH. $[\text{V(IV)}] = [\text{V(V)}] = 1 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$; $[\text{dPKBH}] = 3,25\cdot 10^{-4} \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$; 10% etanol. pH = 4,7. $\Delta A = A_{\text{complejo}} - A_{\text{blanco}}$.

Desarrollo, optimización y validación de nuevos métodos analíticos

Como se puede observar, para el complejo formado por V(V) las medidas se muestran poco afectadas por la concentración de disolución reguladora, mientras que para V(IV) éstas disminuyen prácticamente de forma lineal a partir de $1 \cdot 10^{-2} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ hasta la concentración más alta estudiada. En este sentido, y dado que concentraciones bajas de reguladora son suficientes para mantener el pH adecuado sin restar sensibilidad en las medidas de V(IV), se seleccionó $4 \cdot 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ como concentración adecuada.

Concentración óptima de dPKBH

Se ha estudiado el efecto que provoca en la señal analítica la variación de la concentración de reactivo quelatante. Para ello, se varía la concentración final del reactivo en las disoluciones entre $1,3 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ y $1,3 \cdot 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ y se preparan diversas disoluciones que contienen $1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ de V(IV) ó V(V) en las condiciones de pH óptimo, así como sus correspondientes blancos. En estas condiciones, los valores de absorbancia para cada una de las muestras ensayadas aumentan progresivamente con la concentración de reactivo hasta $4,0 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$, mostrándose prácticamente constantes a partir de dicha concentración tanto para el complejo formado con V(IV) como para el de V(V).

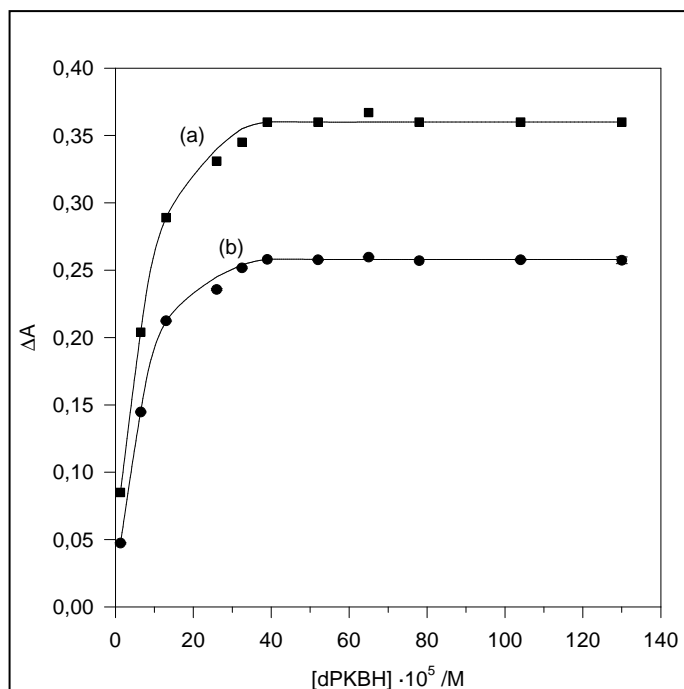


Figura 2.40. Efecto de la concentración de reactivo. a) V(IV)-dPKBH y b) V(V)-dPKBH. [V(IV)] = [V(V)] = $1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$; [HAc/NaAc] = $4 \cdot 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$; pH = 4,7; 10% etanol. $\Delta A = A_{\text{complejo}} - A_{\text{blanco}}$.

CAPÍTULO 2

En la figura 2.40 se muestran los resultados a los que se llegan. De este modo, la concentración de reactivo elegida para la formación de los complejos en experimentos posteriores fue de $4,0 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$.

Naturaleza acuoetanólica del medio

Como en los complejos de cobre y cinc con el ligando, para estudiar el efecto del contenido etanólico del medio se preparan disoluciones que contienen $1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ de V(IV) ó V(V); $4,0 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ dPKBH y $4,0 \cdot 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ de la disolución reguladora a pH 4,7, así como sus blancos correspondientes, y se varía el porcentaje final de etanol en las mismas en el intervalo comprendido entre 3-50 %. En la figura 2.41 se muestran los resultados. Como se puede observar, en ambos casos se obtiene una excelente reproducibilidad en las medidas para contenidos bajos de etanol (<10%) mientras que a valores superiores a 20% se observó la aparición de turbidez en las muestras. Para valores más elevados, se produce además un descenso en la absorbancia del complejo.

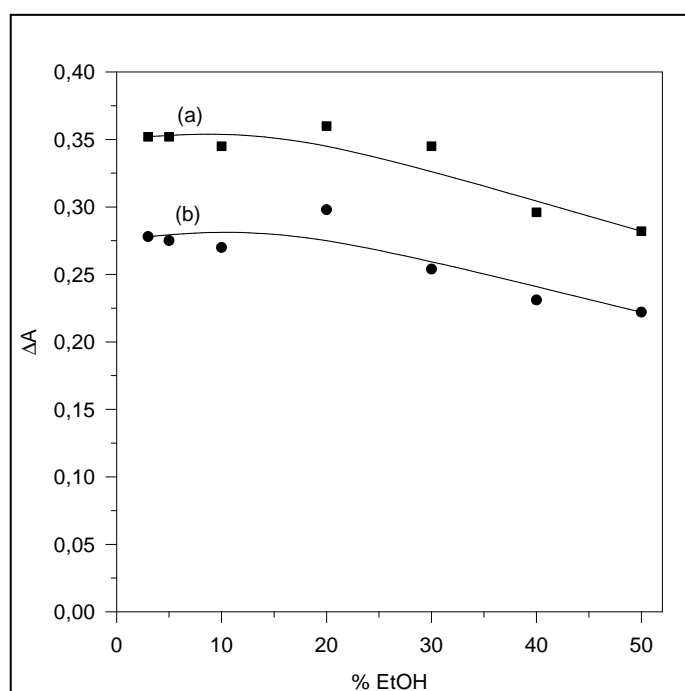


Figura 2.41. Efecto del contenido en etanol. a) V(IV)-dPKBH y b) V(V)-dPKBH. $[\text{V(IV)}] = [\text{V(V)}] = 1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$; $[\text{dPKBH}] = 4,0 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$; $[\text{HAc/NaAc}] = 4,0 \cdot 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$; pH = 4,7. $\Delta A = A_{\text{complejo}} - A_{\text{blanco}}$.

Desarrollo, optimización y validación de nuevos métodos analíticos

Por tanto, para obtener la formación de los complejos en condiciones adecuadas y las medidas con mayor precisión se tomó como óptimo un porcentaje final de etanol de 5% v/v.

Orden de adición de reactivos

Para ello, se preparan varias disoluciones conteniendo $1 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ V(IV) ó V(V), y sus correspondientes blancos, en las condiciones experimentales anteriormente seleccionadas como óptimas, y se varia el orden de adición de los reactivos como se muestra en la tabla 2.29.

Tabla 2.29. Efecto del orden de adición de reactivos.

Orden de adición	ΔA^a	ΔA^b
V-tampón-dPKBH-etanol	$0,352 \pm 0,001$	$0,278 \pm 0,001$
V-tampón-etanol-dPKBH	$0,350 \pm 0,001$	$0,276 \pm 0,001$
V-etanol-dPKBH-tampón	$0,348 \pm 0,001$	$0,274 \pm 0,001$
V-dPKBH-etanol-tampón	$0,349 \pm 0,001$	$0,274 \pm 0,001$

^adPKBH-V(IV); ^bdPKBH-V(V)

De los valores de absorbancia que se detallan en la tabla, se comprueba que éstos son prácticamente independientes del orden de adición en ambos casos. Por tanto, el orden elegido para la formación de los complejos fue el primero, ya que es posiblemente el más adecuado cuando se trate de aplicar a muestras reales: V(IV/V), tampón acético/acetato, dPKBH y etanol.

Estequiometría de los complejos

Como en los casos precedentes se han aplicado el método de Job o de las variaciones continuas y el método de la razón molar. En la figura 2.42 se muestran los resultados que se obtienen mediante el método de Job para ambos complejos. En la misma se observa que cuando se aplica este método para el complejo de V(IV) el punto de corte de ambas rectas se obtiene para $X_{V(IV)} = 0,34$ mientras que para el de V(V) este vale $X_{V(V)} = 0,5$.

CAPÍTULO 2

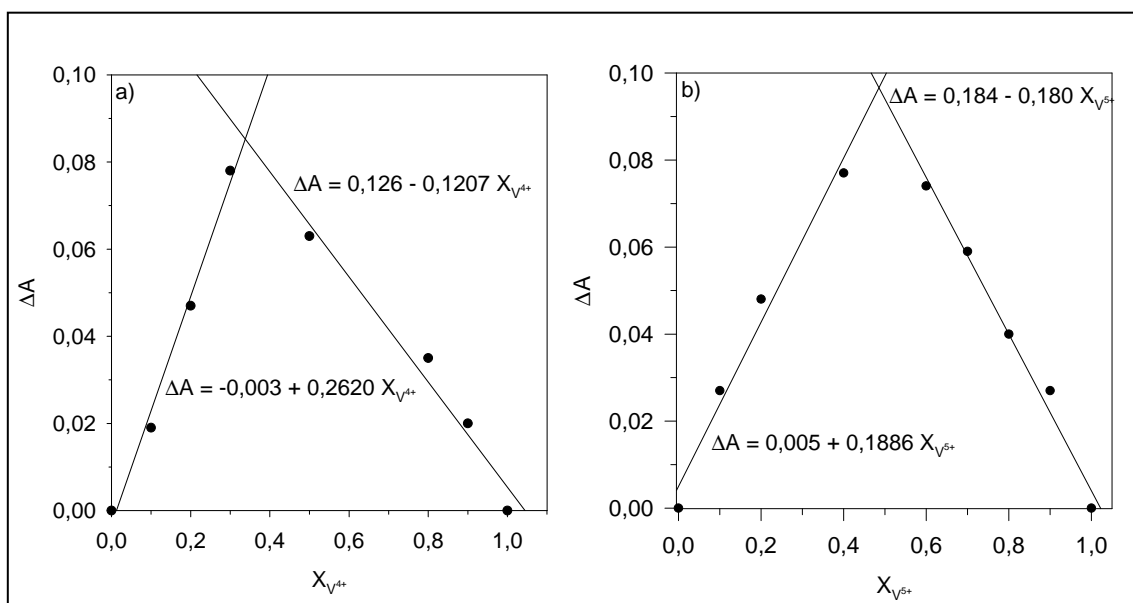


Figura 2.42. Método de Job para los complejos a) V(IV)-dPKBH y b) V(V)-dPKBH.

Estos resultados sugieren una relación molar V(IV):dPKBH 1:2, la misma que ya se había obtenido anteriormente para los complejos formados por el reactivo con Cu(II) y Zn(II), ratificándose una vez más la afinidad de éste por cationes divalentes. Además, se corrobora que posiblemente la presencia de V(IV) en el complejo es en forma de catión vanadilo (VO^{2+}), que es la forma estable de vanadio cuando se encuentra en este estado de oxidación. No obstante, cuando se encuentra en el estado de oxidación superior, se obtiene que la relación molar V(V):dPKBH es 1:1. En este caso, la especie predominante es VO_2^+ .

Los resultados que se obtienen cuando se aplica el método de la razón molar para ambos complejos se detallan en la figura 2.43. Igual que en el caso anterior, para cada complejo se pueden extrapolar dos líneas rectas cuyo punto de corte coincide con la relación de moles entre el reactivo y el catión. Así, para el complejo con V(IV) éste vale 2,1, lo que indica relación 1:2 catión:ligando (V(IV):dPKBH), mientras que cuando se aplica este mismo método al complejo de V(V) se obtiene que el punto de corte de ambas rectas vale 1,1.

Desarrollo, optimización y validación de nuevos métodos analíticos

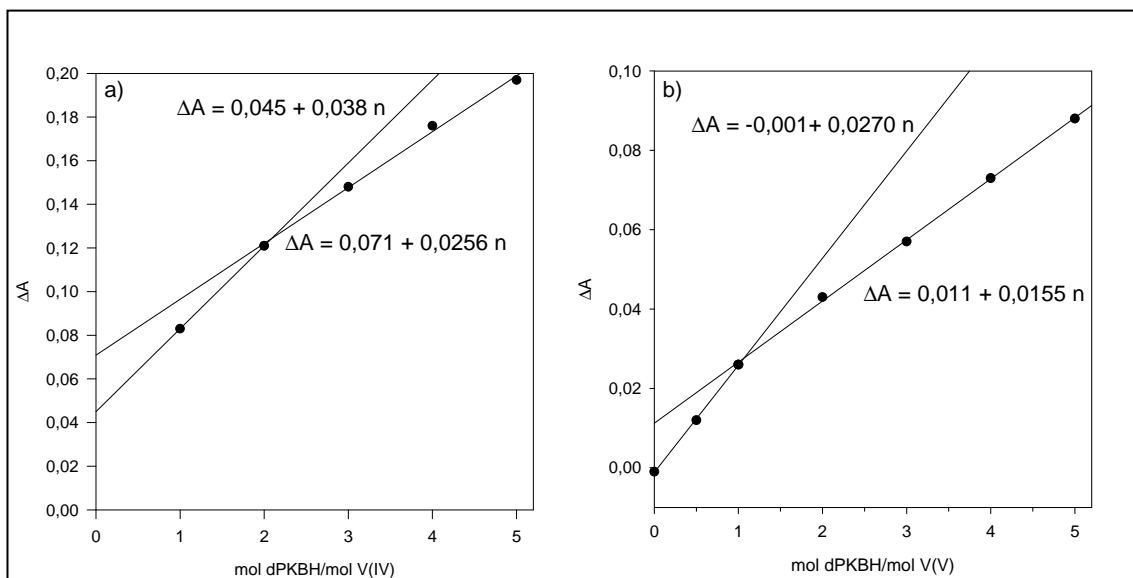


Figura 2.43. Método de la Razón Molar para los complejos a) V(IV)-dPKBH y b) V(V)-dPKBH.

Por tanto, y del mismo modo que ocurría para cobre y cinc, el enlace formado por el catión VO^{2+} con cada molécula de reactivo debe ocurrir probablemente como consecuencia de la desprotonación de cada grupo CONH del reactivo. Así, en la figura 2.44 se propone la estructura para el complejo V(IV)-dPKBH en disolución.

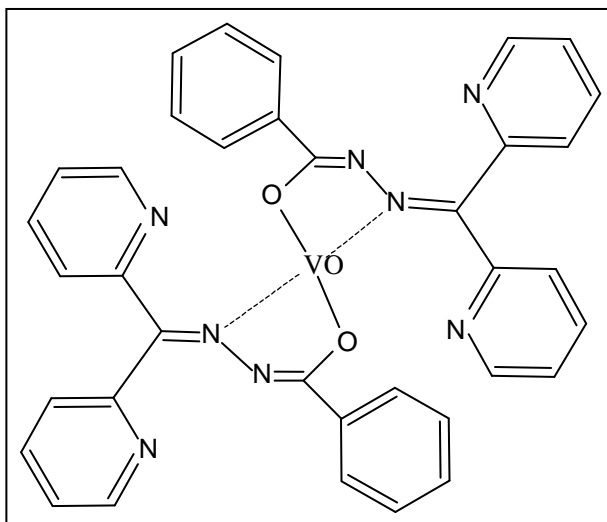


Figura 2.44. Estructura propuesta para el complejo V(IV)-dPKBH.

CAPÍTULO 2

Por otra parte, en la figura 2.45 se propone la estructura para el complejo V(V)-dPKBH en disolución. En esta ocasión, el catión VO_2^+ es angular y el enlace entre el átomo de vanadio con el ligando puede realizarse probablemente a través del átomo de oxígeno del grupo amida.

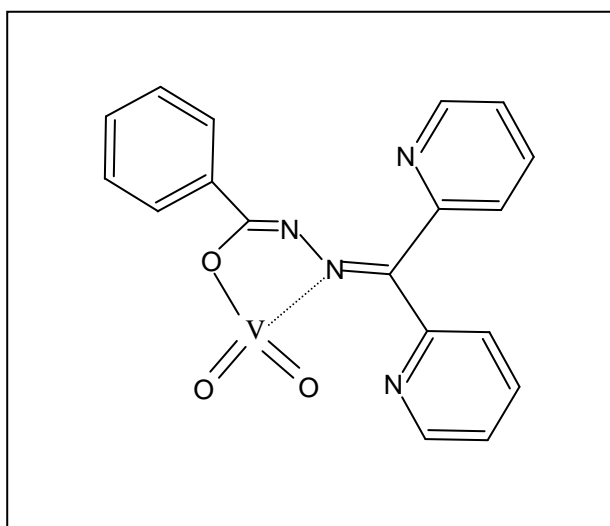


Figura 2.45. Estructura propuesta para el complejo V(V)-dPKBH

Estabilidad de los complejos

Para ello, se preparan las disoluciones de los complejos V(IV)-dPKBH y V(V)-dPKBH en las condiciones previamente descritas y se realizan las medidas de absorbancia en función del tiempo. En la figura 2.46 se exponen los resultados que se alcanzan y, como se puede observar, la absorbancia permanece estable durante al menos 24 horas para el complejo de V(V). Para el complejo de V(IV) no se obtiene el mismo comportamiento, ya que a partir de 15 horas se observa un descenso progresivo de la señal, llegando hasta el 15% cuando han transcurrido 24. Este comportamiento puede justificarse si se considera que en el medio en el que tiene lugar la formación del complejo pueden darse las condiciones adecuadas para que tenga lugar la oxidación lenta pero progresiva del catión V(IV) a V(V). Esto es, una vez formado el complejo con V(IV) se realiza inmediatamente la medida de su absorbancia y la disolución se conserva en el matraz durante todo el proceso, lo que implica que cada vez que se realice una medida se renueva la cantidad de oxígeno existente en el matraz, lo que

Desarrollo, optimización y validación de nuevos métodos analíticos

favorece la consiguiente oxidación del catión V(IV) a V(V).

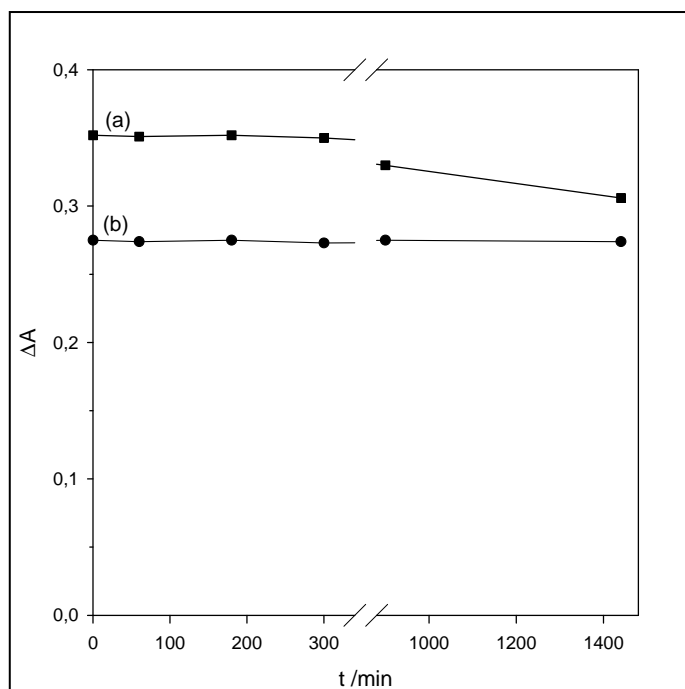


Figura 2.46. Estabilidad de los complejos a) V(IV)-dPKBH y b) V(V)-dPKBH. $[V(IV)] = [V(V)] = 1 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$; $[dPKBH] = 4,0\cdot 10^{-4} \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$; $[HAc/NaAc] = 4,0\cdot 10^{-3} \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$; 5% etanol.
 $\Delta A = A_{\text{complejo}} - A_{\text{blanco}}$

Para verificar que tiene lugar el proceso de oxidación, se llevan a cabo las dos experiencias que a continuación se detallan. En la primera, se preparan tres disoluciones idénticas del complejo dPKBH-V(IV) en las condiciones optimizadas y sus blancos correspondientes. A continuación se obtiene el espectro de una de ellas inmediatamente después de la mezcla de todos los reactivos. Otra se deja estar, junto con su blanco, durante 24 horas y posteriormente se mide su espectro. A la tercera, y también a su respectivo blanco, se les pasa durante 45 minutos una corriente de aire y se dejan estar también durante 24 horas antes de obtener el espectro. De los resultados que se muestran en la figura 2.47 se observa, en primer lugar, un efecto hipocrómico en la señal del complejo transcurridas 24 horas desde su formación, como ya se ha indicado en el estudio de estabilidad (figura 2.46). Dicho efecto es aún más acusado en la disolución a la que previamente se le ha pasado la corriente de aire. Por otro lado, también se produce el efecto batocrómico, desplazándose el máximo de absorción hacia

CAPÍTULO 2

longitudes de onda cercanas al máximo de absorción del complejo dPKBH-V(V).

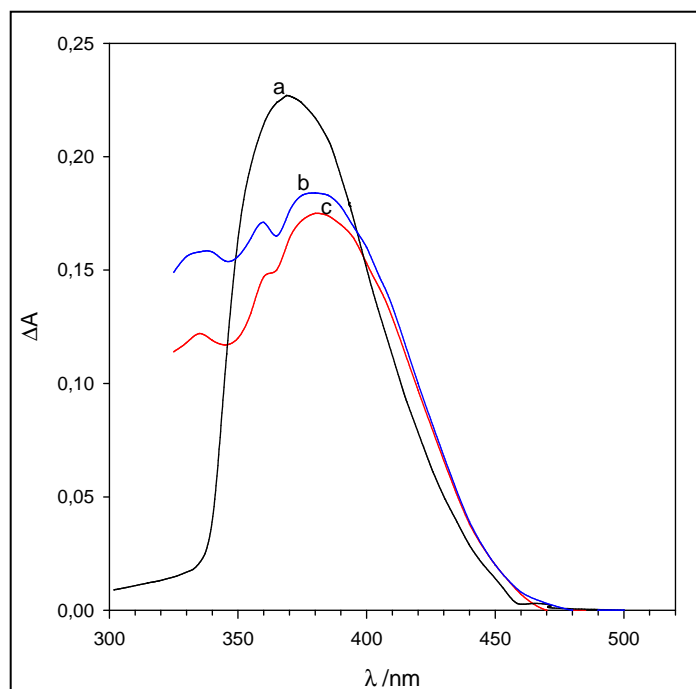


Figura 2.47. Espectros del complejo dPKBH-V(IV). a) Tras la adición de los reactivos, b) transcurridas 24 horas y c) tras pasar 45 minutos una corriente de aire y dejar 24 horas. $[V(IV)] = 0,8 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$; $[dPKBH] = 4,0\cdot 10^{-4} \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$; 5% etanol; $[HAc/NaAc] = 4,0\cdot 10^{-3} \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$. $\Delta A = A_{\text{complejo}} - A_{\text{blanco}}$.

En la segunda experiencia, se preparan, en las condiciones previamente establecidas, una disolución que contiene $1 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de V(IV), otra de la misma concentración pero de V(V) así como el blanco correspondiente. Tanto a las disoluciones de vanadio como al blanco se les adiciona 2 gotas de peróxido de hidrógeno y se dejan estar durante 24 horas. Transcurrido ese tiempo se obtiene el espectro de cada una frente al blanco. Los resultados que se muestran en la figura 2.48 indican que, en estas condiciones, los espectros de ambas disoluciones son idénticos, coincidiendo además, con el máximo de absorción del complejo dPKBH-V(V) (ver figura 2.37).

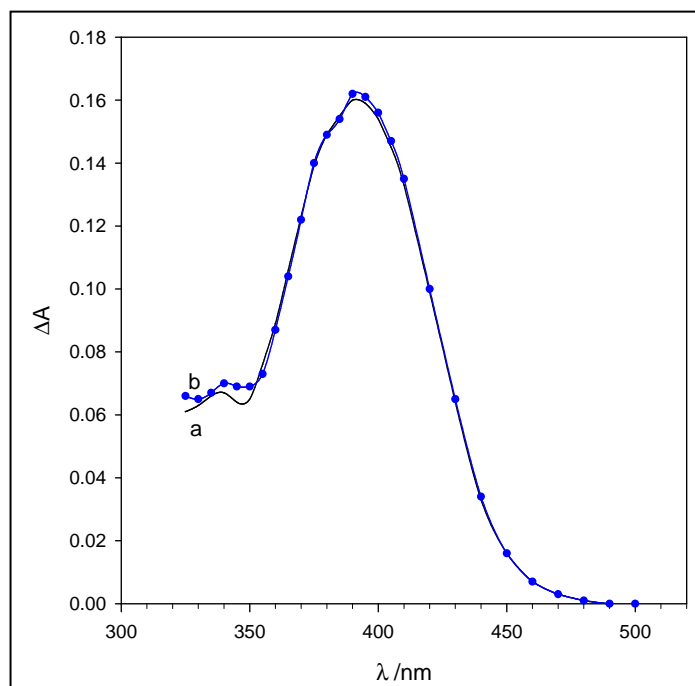
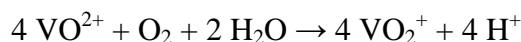


Figura 2.48. Espectros con H₂O₂. a) dPKBH-V(V) y b) dPKBH-V(IV). [V(IV)]=[V(V)]= 1 mg·L⁻¹; [dPKBH] = 4,0·10⁻⁴ mol·L⁻¹; 5% etanol; [HAc/NaAc] = 4,0·10⁻³ mol·L⁻¹. ΔA = A_{complejo} - A_{blanco}.

Por tanto, los resultados que se alcanzan en ambas experiencias demuestran la oxidación de V(IV) a V(V), coincidiendo entre otros, con los obtenidos por Zhou Nan al estudiar el sistema de V(IV) con N-benzoíl-N-fenilhidroxilamina (BPHA)²¹³. El autor concluía que en un medio ligeramente ácido la reacción que tenía lugar entre V(IV) y BPHA originaba la formación de un quelato de V(V). Además, indicaba que incluso a pH 2 y en presencia de oxígeno atmosférico, las disoluciones de V(IV) sufrían oxidación, proponiendo la siguiente reacción para justificar dicho proceso:



²¹³ Nan, Z. Reaction mechanism of N-benzoyl-N-phenylhydroxylamine with vanadium(IV) in the weakly acidic medium. *Talanta*, 52, 785, 2000.

CAPÍTULO 2

3.3.3. Validación de los métodos

Una vez que se estudiaron y optimizaron todas las variables químicas que afectaban a ambos sistemas de medida, se procede al análisis de aquellas características analíticas que permiten evaluar la bondad de las nuevas metodologías desarrolladas.

Intervalo de linealidad

En la figura 2.49 se muestran los resultados obtenidos entre 0 y 5 mg·L⁻¹ de V(IV) y V(V), observándose un comportamiento lineal para la concentración hasta 3 mg·L⁻¹ en ambos casos. Del mismo modo que en los casos precedentes, para verificarlo se calcula la diferencia, expresada como porcentaje, entre los resultados experimentales y el que se obtiene a partir de la ecuación de la recta para 3 mg·L⁻¹ y 4 mg·L⁻¹ de V(IV) y V(V). Así, para 3 mg·L⁻¹ se obtiene -2,7% y -1,6% mientras que es -9,1% y -9,9% en el caso de 4 mg·L⁻¹ para V(IV) y V(V), respectivamente.

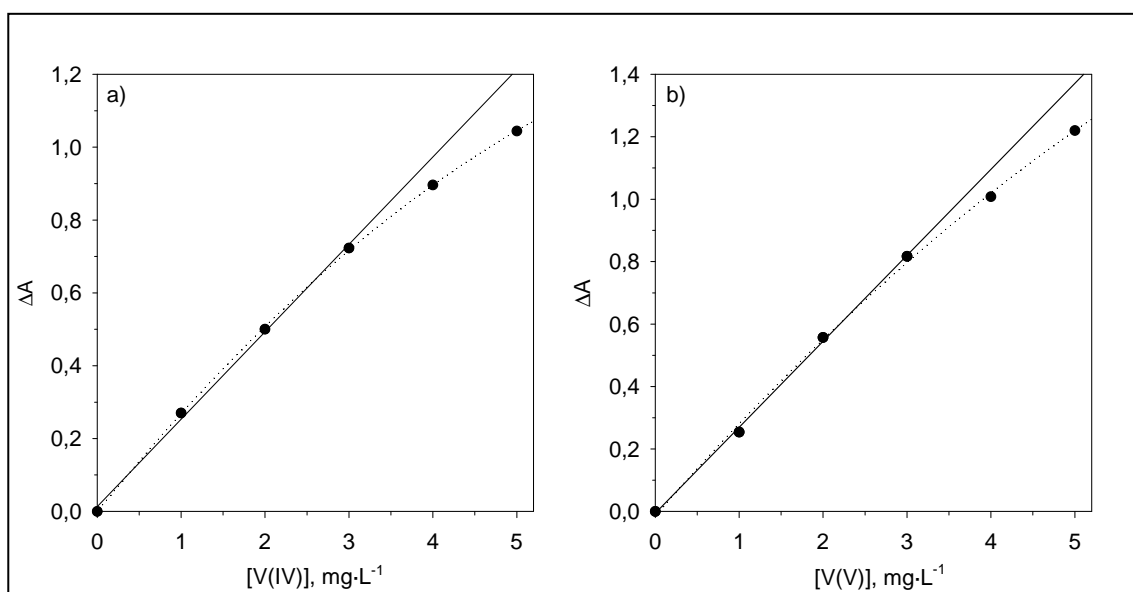


Figura 2.49. Intervalo de linealidad para a) V(IV) y b) V(V). [dPKBH] = $4,0 \cdot 10^{-4}$ mol·L⁻¹; [HAc/NaAc] = $4,0 \cdot 10^{-3}$ mol·L⁻¹; 5% etanol. $\Delta A = A_{\text{complejo}} - A_{\text{blanco}}$.

Utilizando los datos de las gráficas anteriores en los que el comportamiento de ambos sistemas es lineal, se obtiene la siguiente ecuación de ajuste para altas concentraciones de V(IV):

Desarrollo, optimización y validación de nuevos métodos analíticos

$$A = 0,2399 (\pm 0,0248) [V(IV)] + 0,013 (\pm 0,046) \quad r^2 = 0,9979$$

Y, para altas concentraciones de V(V):

$$A = 0,2754 (\pm 0,0209) [V(V)] - 0,006 (\pm 0,039) \quad r^2 = 0,9989$$

En éstas, se indican entre paréntesis los intervalos de confianza obtenidos para las pendientes y las ordenadas en el origen. Éstos se calcularon como ts_a y ts_b , siendo s_a y s_b las desviaciones estándar relativas para las pendientes y las ordenadas en el origen, respectivamente, y t es el parámetro de la distribución de Student para $n-2$ grados de libertad al 95% de confianza ($p = 0,05$).

Absortividad molar

Para obtener el valor de este parámetro se estudiaron cuatro intervalos de concentración diferentes para cada uno de los cationes: 0 a 3 mg·L⁻¹; 0 a 2 mg·L⁻¹; 0 a 1 mg·L⁻¹ y 0 a 0,1 mg·L⁻¹, respectivamente. Tras mezclar todos los reactivos, se realizan las medidas a 374,4 nm ó 395,2 nm (para V(IV) ó V(V), respectivamente) y posteriormente se calculan las correspondientes rectas de regresión. Dado que las medidas se realizaron en todo momento empleando una cubeta de cuarzo de 1 cm de paso de luz, las pendientes de las rectas de regresión coincidían con el valor de absortividad molar del método. En esta ocasión, los valores que se obtienen son:

$\epsilon_{V(IV)} = 1,29(\pm 0,06) \cdot 10^4 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$	$\epsilon_{V(V)} = 1,42(\pm 0,02) \cdot 10^4 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$
--	---

Límites de detección y cuantificación

Para ello, y considerando los bajos niveles de concentración en los que puede encontrarse el analito en las muestras acuosas naturales, se construyeron diversas rectas de calibrado en las que se iba reduciendo el intervalo de concentración de vanadio. Cada una de ellas estaba formada por cinco puntos, obtenidos cada uno de ellos como el valor medio de tres determinaciones. En la figura 2.50 se muestra, a modo de ejemplo, la

CAPÍTULO 2

recta de regresión obtenida para el intervalo de concentraciones más bajo estudiado para V(V).

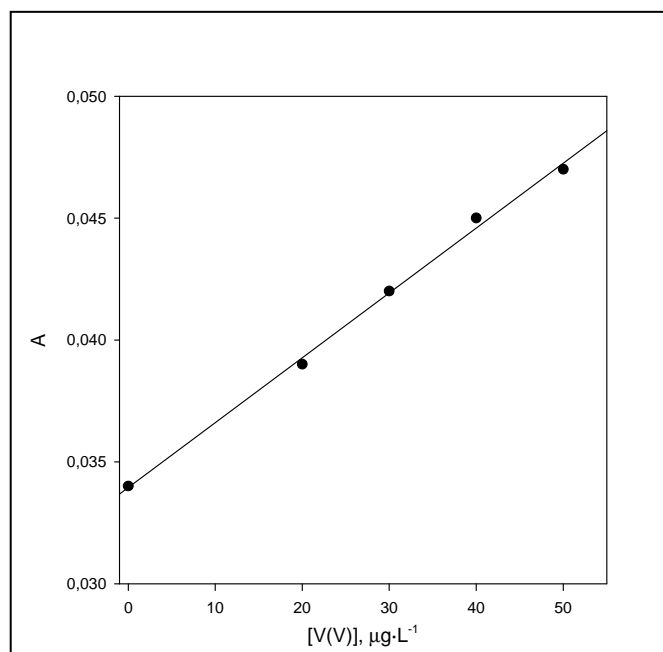


Figura 2.50. Recta de regresión para trazas de V(V).

En la tabla 2.30 se muestran los parámetros de ajuste obtenidos para las diferentes rectas de regresión, indicándose en la última columna los límites de detección para cada intervalo. De este modo, se puede observar que utilizando el intervalo de concentraciones más bajo para ambos, los límites de detección son:

L.D. = 2,0 µg·L⁻¹ (para V(IV))	L.D. = 3,2 µg·L⁻¹ (para V(V))
--	---

Estos valores de límite de detección indican que el método espectrofotométrico desarrollado proporciona una sensibilidad del mismo orden de magnitud que algunos métodos atómicos e incluso es mejor que la práctica totalidad de métodos espectrofotométricos ya descritos en la introducción de la presente memoria.

Desarrollo, optimización y validación de nuevos métodos analíticos

Tabla 2.30. Intervalos de concentración empleados para calcular el límite de detección.

Intervalo (mg·L ⁻¹)	Ordenada en el origen	Pendiente	r ²	^a s _a	^a s _b	L.D. (mg·L ⁻¹)
0 – 2 ^b	0,0823	0,2588	0,9985	0,0008	0,0033	0,286
0 – 0,5 ^b	0,0740	0,2960	0,9987	0,0020	0,0192	16,3·10 ⁻³
0 – 0,05 ^b	0,0538	0,3258	0,9982	0,0004	0,0156	2,0·10 ⁻³
0 – 2 ^c	0,0504	0,2794	0,9975	0,0140	0,0080	0,145
0 – 0,5 ^c	0,0358	0,2750	0,9969	0,0020	0,0088	19,9·10 ⁻³
0 – 0,05 ^c	0,0339	0,2662	0,9970	0,0003	0,0085	3,2·10 ⁻³

^a s_a y s_b son las desviaciones estándar de la ordenada en el origen y la pendiente, respectivamente; ^b Rectas para V(IV); ^c Rectas para V(V).

De manera análoga, los límites de cuantificación (L.C.) de cada método, empleando los intervalos de concentraciones más bajos para cada uno, son:

L.C. = 6,7 µg·L⁻¹ (para V(IV))	L.C. = 10,7 µg·L⁻¹ (para V(V))
--	--

Precisión

Para establecer la precisión se prepararon once disoluciones que contenían 1 mg·L⁻¹ V(IV) así como otras once disoluciones que contenían 1 mg·L⁻¹ V(V). Tras la adición de los distintos reactivos en las condiciones óptimas, se midieron frente a sus blancos correspondientes. Como puede observarse en la figura 2.51, los resultados alcanzados indican una adecuada *repetibilidad* de las medidas:

R.S.D. = 0,57% (para V(IV))	R.S.D. = 1,87% (para V(V))
------------------------------------	-----------------------------------

Para evaluar la *reproducibilidad* se utilizaron los resultados obtenidos tras el análisis de disoluciones que contenían la misma concentración, tanto para V(IV) como para V(V), pero realizados en días diferentes.

R.S.D. = 0,91% (para V(IV))	R.S.D. = 2,28% (para V(V))
------------------------------------	-----------------------------------

CAPÍTULO 2

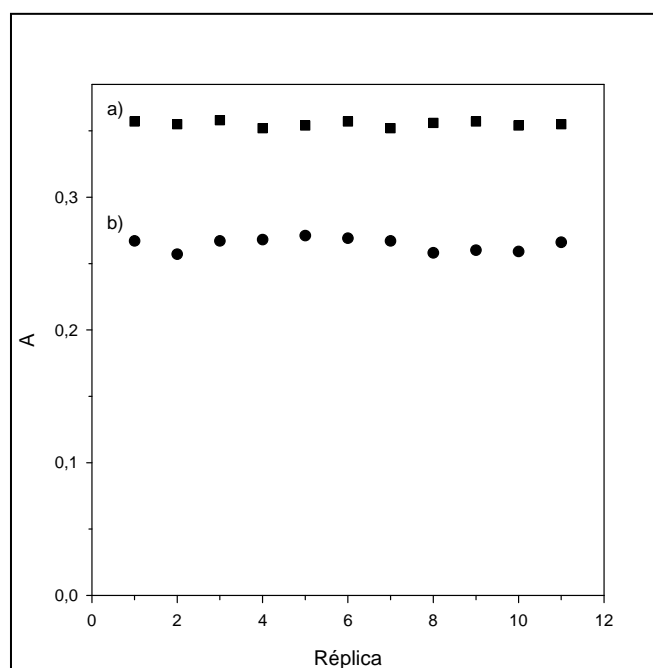


Figura 2.51. Precisión de las medidas. a) dPKBH-V(IV). b) dPKBH-V(V).

Por tanto, se puede concluir que el método desarrollado proporciona una buena precisión en las medidas.

Estudio de Interferencias

Para ello, se observa la variación que experimenta la absorbancia de una disolución que contiene $500 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ de V(IV) o V(V) tras la adición del posible ión interferente.

En esta ocasión, hay que señalar que ya se partía con la información previamente obtenida cuando se estudiaron las interferencias para los complejos de Cu(II) y Zn(II) (véase tabla 2.7). Por tanto, considerando que en la mayoría de las medidas espectrofotométricas las interferencias surgen como consecuencia de reacciones competitivas entre el ligando y la especie potencialmente interferente, cabía esperar que el comportamiento del sistema fuera similar no sólo al observado en los casos precedentes sino también para ambas especies de vanadio. En este sentido, parecía lógico esperar que la adición de los diferentes aniones a la disolución que contenía el vanadio condujera a resultados similares a los que se obtuvieron para cobre y cinc. Así, el estudio de éstos se efectuó comprobando su potencial interferencia en las relaciones

Desarrollo, optimización y validación de nuevos métodos analíticos

molares con vanadio más elevadas, esto es, 1:20.000. Para el caso de los cationes se empleó el mismo razonamiento, estudiándose tan sólo aquellos que habían presentado los efectos más importantes.

Aniones

Como se ha mencionado anteriormente, se utilizaron sales sódicas, potásicas y amónicas en todos los casos en los que fue posible. Para efectuar los ensayos correspondientes se prepararon disoluciones concentradas en cada anión. A partir de ellas, mediante dilución, se prepararon las disoluciones adecuadas para obtener las relaciones molares entre metal y especie interferente.

Haluros. En la tabla 2.31 se indican las distintas disoluciones que se emplearon para llevar a cabo este estudio. Dado que ninguno de ellos presentaba interferencia en la determinación de cobre y cinc por medio de su complejo con dPKBH en la relación molar más alta estudiada, se comenzó inicialmente comprobando el efecto que provocaba en la absorbancia de los complejos V(IV)-dPKBH y V(V)-dPKBH su adición en relación molar 1:20.000. En dicha tabla se muestran los resultados que se obtuvieron, indicándose en cada columna el porcentaje de variación de la absorbancia de las disoluciones utilizadas tras añadir la posible especie interferente para los complejos de V(IV) y V(V), respectivamente. Como se puede observar, en ningún caso se supera el límite establecido, esto es, el 5% de variación, por lo que se constata que la adición de las sales estudiadas pueden tolerarse en el método espectrofotométrico del V(IV)-dPKBH así como en el de V(V)-dPKBH.

Tabla 2.31. Efecto de la adición de haluros en la absorbancia de los complejos V(IV)-dPKBH y V(V)-dPKBH.

Sal añadida	V(IV)-dPKBH + Sal /ΔA (%)	V(V)-dPKBH + Sal /ΔA (%)
NaCl	- 3,3	- 3,4
KBr	- 2,7	- 1,4
NH ₄ F	- 3,5	- 3,1
KI	- 3,9	- 3,3

CAPÍTULO 2

Nitratos y nitritos. En esta ocasión la relación más alta que se ha utilizado para nitritos fue 1:100. Las sales utilizadas así como los resultados que se obtienen, mostrados en la tabla 2.32, ponen de manifiesto la ausencia de interferencias de estas especies en las relaciones molares estudiadas.

Tabla 2.32. Efecto de la adición de nitratos y nitritos en la absorbancia de los complejos V(IV)-dPKBH y V(V)-dPKBH.

Sal añadida	V(IV)-dPKBH + Sal / ΔA (%)	V(V)-dPKBH + Sal / ΔA (%)
NaNO ₃	- 2,2	- 2,0
NH ₄ NO ₃	- 2,2	- 1,9
NaNO ₂	- 1,7	- 1,3

Sulfato y tiosulfato. Del mismo modo que en los casos precedentes, se prepararon las disoluciones del blanco, de control y con los posibles interferentes. En esta ocasión, las relaciones más altas utilizadas fueron 1:100 para sulfato y 1:1.000 para tiosulfato. Los resultados que se alcanzan se detallan en la tabla 2.33 e indican que la presencia de sulfatos y tiosulfatos en las relaciones molares estudiadas no producen interferencias en las medidas.

Tabla 2.33. Efecto de la adición de sulfato y tiosulfato en la absorbancia de los complejos V(IV)-dPKBH y V(V)-dPKBH.

Sal añadida	V(IV)-dPKBH + Sal / ΔA (%)	V(V)-dPKBH + Sal / ΔA (%)
Na ₂ SO ₄	- 4,1	- 4,0
Na ₂ S ₂ O ₃ ·5H ₂ O	3,3	3,0

Acetato, oxalato, citrato y tartrato. En esta ocasión se comprueba que la adición de oxalato y citrato interfiere en la señal del blanco, mientras que para acetato y tartrato se utiliza la relación molar más alta, esto es, 1:20.000. En la tabla 2.34 se detallan los resultados que se alcanzan, indicando que la adición de ambos no produce variación en la absorbancia de los complejos.

Desarrollo, optimización y validación de nuevos métodos analíticos

Tabla 2.34. Efecto de la adición de acetato y tartrato en la absorbancia de los complejos V(IV)-dPKBH y V(V)-dPKBH.

Sal añadida	V(IV)-dPKBH + Sal / ΔA (%)	V(V)-dPKBH + Sal / ΔA (%)
NaCH ₃ COO	1,7	1,5
KSbC ₄ H ₄ O ₇ ·½H ₂ O	0,5	0,4

Cationes

Como ya se ha indicado anteriormente, tan sólo se han estudiado las posibles interferencias causadas por aquellas especies catiónicas que presentan los mayores efectos en la medida de los complejos de cobre y cinc, (véanse tablas 2.7, 2.20 y 2.21). En este sentido, se ha comenzado el estudio ensayando en primer lugar las relaciones molares catión:vanadio a las que los primeros ya habían presentado interferencias en las medidas de cobre y cinc. A continuación, y en función de los resultados obtenidos, se ha variado dicha relación para determinar el límite de tolerancia para cada uno de los metales ensayados. Para cada uno de ellos se dispone de disoluciones patrón de 1 g·L⁻¹ del catión correspondiente, a partir de las cuales se efectúan las diluciones adecuadas para tener en la disolución final las relaciones molares oportunas.

Debido a que en el estudio de las interferencias aniónicas se han empleado sales sódicas, potásicas o amónicas, la información obtenida también es aplicable a estos cationes. Los resultados extrapolados se detallan en la tabla 2.35. Éstos se calculan como la media de los valores de absorbancia que presentan en cada una de las sales en las que se encontraban presentes en el estudio de los aniones. Como puede deducirse, la adición de éstos no afecta a la medida hasta la relación molar más alta estudiada, esto es, 1:20.000.

CAPÍTULO 2

Tabla 2.35. Efecto de la adición de sodio, potasio y amonio en la absorbancia de los complejos V(IV)-dPKBH y V(V)-dPKBH.

Catión	V(IV)-dPKBH + Catión /ΔA (%)	V(V)-dPKBH + Catión /ΔA (%)
Na ⁺	- 1,3	- 1,3
K ⁺	- 2,2	- 1,4
NH ₄ ⁺	- 2,9	- 2,5

Para el resto de metales ensayados, los resultados se presentan en función de su pertenencia a los distintos grupos principales del sistema periódico o a las diferentes series de transición, como se expone en la tabla 2.36.

Tabla 2.36. Cationes ensayados como posibles interferentes.

Grupo	Cationes
13	Al(III)
14	Sn(II), Pb(II)
1ª Serie transición	Ti(IV), Cr(III), Zn(II), Cu(II), Fe(III), Ni(II)
2ª Serie transición	Cd(II)

Elementos de los grupos 13-14. Se han preparado disoluciones en las que las relaciones molares respecto de vanadio fueron 1:1, 10:1 y 1:1, para Sn(II), Al(III) y Pb(II), respectivamente. Los resultados que se obtienen indican que, para dichas relaciones molares, los cationes estudiados provocan interferencias. Por tanto, se ensayan relaciones molares más bajas para evaluar el límite de tolerancia para cada catión. Así, en la tabla 2.37 se presentan los resultados obtenidos, indicándose entre paréntesis las relaciones molares catión:vanadio a las que éstos no interfieren. Los resultados mostrados indican que, para los cationes ensayados, éstos presentan un comportamiento ligeramente distinto dependiendo del estado de oxidación en el que se encuentre el vanadio. En este sentido, se obtienen niveles de tolerancia superiores para cada uno de los cationes cuando el vanadio se encuentra en estado de oxidación (IV).

Desarrollo, optimización y validación de nuevos métodos analíticos

Tabla 2.37. Límites de tolerancia de los cationes ensayados para la determinación de vanadio.

Catión	V(IV)–dPKBH + Catión ΔA (%)	V(V)–dPKBH + Catión ΔA (%)
Sn(II)	- 0,7 (0,1:1)	13,5 (0,1:1)
Al(III)	1,4 (2:1)	4,0 (0,5:1)
Pb(II)	- 0,3 (0,1:1)	8,3 (0,1:1)

Elementos de la 1ª y 2ª Series de Transición. En esta ocasión, y teniendo como referencia la información obtenida en los estudios precedentes, la relación molar más alta estudiada para todos los cationes respecto de vanadio fue 1:1. Así, en la tabla 2.38 figuran los resultados que se obtienen.

Tabla 2.38. Interferencias causadas por los elementos de las 1ª y 2ª series de transición.

Catión	V(IV)–dPKBH + Catión ΔA (%)	V(V)–dPKBH + Catión ΔA (%)
Cu(II)	>100,0	> 100,0
Ni(II)	> 100,0	> 100,0
Zn(II)	> 100,0	> 100,0
Cd(II)	- 2,8	11,5
Fe(III)	> 100,0	> 100,0
Ti(IV)	> 100,0	> 100,0
Cr(III)	- 2,8	2,9

De los cationes ensayados, tan sólo Cr(III) presenta un comportamiento similar en ambos casos, por lo que se aumenta la relación molar entre éste y vanadio para obtener el nivel de tolerancia. En este sentido, para el complejo con V(IV) la relación más alta tolerada es 10:1 (-4,9%), llegando sólo a 2:1 para el de V(V) (4,7%). Por otra parte, la presencia de Cd(II) en la disolución produce un efecto diferente dependiendo del estado de oxidación en el que se encuentre el vanadio. Así, para V(IV) no provoca interferencias, alcanzando el máximo nivel de tolerancia cuando la relación molar es 2:1 (-3,5%). No obstante, para V(V) es necesario disminuir la relación molar hasta 0,1:1 para obtener el mismo efecto (3,4%). Para los demás cationes ensayados se obtienen

CAPÍTULO 2

interferencias significativas, por lo que se preparan distintas disoluciones en las que se reduce progresivamente la relación molar entre el catión interferente (Cu(II), Ni(II), Zn(II), Fe(III) y Ti(IV)) y el vanadio. En todos los casos ensayados se obtienen interferencias significativas incluso en relaciones molares 0,1:1. Así, en la tabla 2.39 se detallan, a modo de ejemplo, los resultados que se alcanzan a medida que se disminuye la relación molar entre V(IV) y el resto de cationes. Como se puede observar, a medida que disminuye la relación molar entre ambos cationes, esto es, la concentración de las especies interferentes en la disolución es menor, más bajo es el porcentaje de variación. Para el complejo de V(V) se sigue el mismo procedimiento, mostrando los resultados un comportamiento similar.

Tabla 2.39. Límite de tolerancia del método de V(IV).

Mⁿ⁺	Mⁿ⁺ + V(IV)–dPKBH ΔA (%)		
	0,5:1	0,25:1	0,1:1
Zn(II)	53,8	34,1	11,4
Ni(II)	>100,0	76,5	43,9
Cu(II)	90,9	40,2	14,4
Fe(III)	>100,0	43,2	31,1
Ti(IV)	> 100,0	37,8	9,1

De estos resultados, se pueden establecer las siguientes conclusiones:

- La mayoría de los aniones ensayados, así como los cationes Na⁺, K⁺ y NH₄⁺, no producen interferencias en la medida de la disolución en relativamente muy altas concentraciones.
- Para aquellos cationes cuyos estados de oxidación son distintos de dos, es decir, Cr(III) y Al(III), se obtienen mayores límites de tolerancia.
- Los elementos cuyo estado de oxidación es dos son los que presentan las mayores interferencias incluso a niveles de concentración inferiores a los de vanadio, como es el caso de Sn(II), Pb(II), Cu(II), Ni(II), Zn(II), y Cd(II). Lo cual es probablemente debido

Desarrollo, optimización y validación de nuevos métodos analíticos

a una competencia entre el ión interferente, el vanadio, tetra- o pentavalente, y el ligando quelatante, que hace que la interacción ión metálico-ligando es superior a la de V-ligando y produciendo además un complejo coloreado.

Estudio de Enmascarantes

En el estudio precedente se ha mostrado que existen una serie de elementos cuya presencia, incluso a niveles de concentración inferiores a los que se encuentra el vanadio, pueden producir interferencias en la medida. Por tanto, se hace necesaria la búsqueda de posibles reacciones de enmascaramiento para estas especies interferentes.

En este sentido, de los posibles agentes enmascarantes encontrados en la bibliografía, se ensayaron el fluoruro amónico y el ácido ciclohexano diamino-tetraacético (CDTA). Como se indica en la tabla 2.31, el ión fluoruro no causa interferencias en las medidas de vanadio en relaciones molares con éste de hasta 20.000. Para el CDTA se ha procedido del mismo modo que en el estudio de interferencias, llegándose previamente a corroborar la ausencia de interferencia en relación 20.000:1 respecto del analito.

Para evaluar la eficacia de cada uno de ellos se seleccionó una muestra de referencia certificada, TMDA-62, cuya composición se muestra en la tabla 2.40. Además, se utiliza otra disolución que contiene $100 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ V(V) y todos los reactivos necesarios en las condiciones óptimas, midiéndose a 395,2 nm frente al blanco correspondiente, que se toma como control.

El estudio comienza analizando, en primer lugar, una alícuota de la muestra TMDA-62 con el método desarrollado, obteniendo de este modo una medida de la absorbancia en ausencia de enmascarantes. Posteriormente, se realiza el mismo proceso a diferentes alícuotas, pero añadiendo además el posible agente enmascarante en diferentes concentraciones. Los valores de absorbancia obtenidos se comparan con el de la muestra TMDA-62 sin enmascarante así como con el de la disolución que contiene tan sólo los $100 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ V(V). De este modo se puede obtener mayor cantidad de información, ya que por una parte se comprueba la eficacia del enmascarante a medida que aumenta su concentración en la muestra de referencia y, por otra, de la comparación con la absorbancia de la disolución que tan sólo contiene el analito se puede comprobar

CAPÍTULO 2

si el enmascarante ha alcanzado su máxima eficacia. Por último, se adicionaron ambos compuestos en distintas concentraciones para comprobar su funcionamiento conjunto.

Tabla 2.40. Valores certificados para los elementos de TMDA-62.

Metal	[M], $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$	Metal	[M], $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$	Metal	[M], $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$
Aluminio	$92,3 \pm 15,6$	Cobre	$106 \pm 10,7$	Níquel	$97,8 \pm 8,77$
Antimonio	$57,7 \pm 11,1$	Cromo	$93,0 \pm 9,41$	Plomo	$98,7 \pm 10,9$
Arsénico	$51,7 \pm 7,24$	Estroncio	$117 \pm 10,0$	Selenio	$50,1 \pm 7,37$
Bario	$115 \pm 9,26$	Hierro	$121 \pm 16,5$	Talio	$51,2 \pm 4,30$
Berilio	$53,7 \pm 6,43$	Litio	$56,3 \pm 6,72$	Uranio	$52,1 \pm 4,92$
Cadmio	$89,9 \pm 8,69$	Manganeso	$103 \pm 9,90$	Vanadio	$108 \pm 8,19$
Cobalto	$100 \pm 7,94$	Molibdeno	$97,6 \pm 9,18$	Cinc	$110 \pm 15,5$

En las figuras 2.52 y 2.53 se presentan los efectos provocados sobre la muestra de referencia por la adición de cada uno por separado. En éstas, se representa en color verde la absorbancia de la disolución que contiene tan sólo $100 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ V(V), en color azul la correspondiente a TMDA-62 sin enmascarantes y, en rojo, la de la muestra TMDA-62 tras la adición del enmascarante en diferentes concentraciones.

De los resultados mostrados en la figura 2.52 se puede observar que la adición de fluoruro amónico produce un descenso progresivo de las interferencias a medida que aumenta su concentración. Así, éstas se reducen desde el 106,2% (TMDA-62 sin fluoruro) hasta un 18,8% para una concentración final $0,04 \text{ M}$ de fluoruro en el matraz. Cuando se utilizan concentraciones de enmascarante más elevadas no se obtienen mejoras significativas.

En el caso del CDTA, cuyos resultados se muestran en la figura 2.53, el descenso observado osciló desde el 106,2% (TMDA-62 sin enmascarante) hasta un 28,1% para una concentración final $3\cdot 10^{-5} \text{ M}$ de CDTA en el matraz.

Estos resultados ponen de manifiesto la adecuación de ambos enmascarantes para reducir las interferencias, no obstante, aún en las concentraciones más elevadas no se consiguen eliminar completamente. Por tanto, se comprobó el efecto que produce en la muestra de referencia la adición conjunta de ambos. Los resultados que se alcanzaron, y que se detallan en la tabla 2.41 para las distintas mezclas utilizadas, indican que la

Desarrollo, optimización y validación de nuevos métodos analíticos

adición de fluoruro amónico y CDTA en concentraciones $4 \cdot 10^{-2}$ M y $3 \cdot 10^{-5}$ M, respectivamente, son adecuadas para eliminar las interferencias.

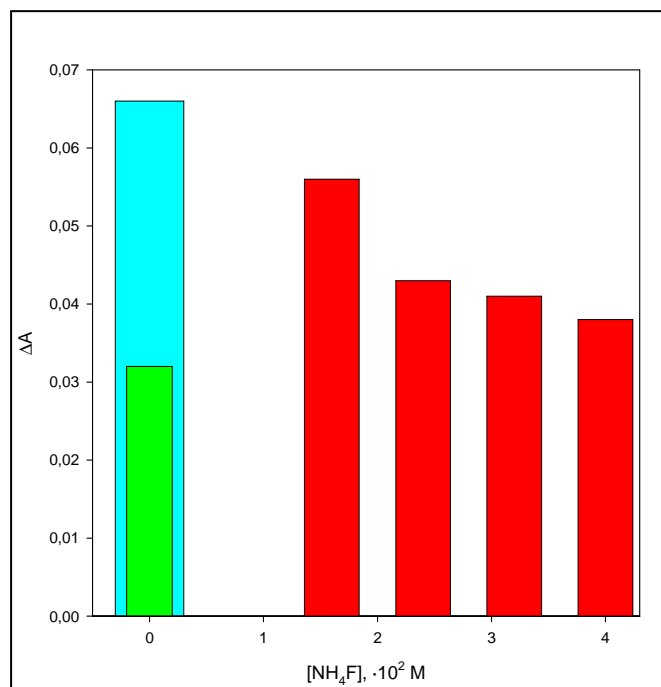


Figura 2.52. Efecto de la adición de fluoruro amónico como agente enmascarante.

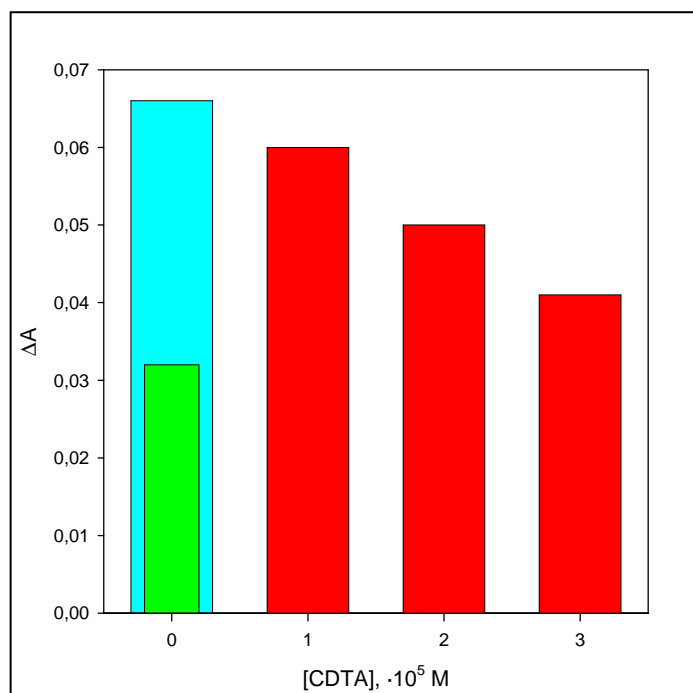


Figura 2.53. Efecto de la adición de CDTA como agente enmascarante.

CAPÍTULO 2

Tabla 2.41. Eficacia de la mezcla de enmascarantes.

M. control ^a	Fluoruro (M)+ CDTA (M)	TMDA-62 + enm. ^b (A)	%ΔA
0,032	---	0,066	106,2
	$3 \cdot 10^{-2} + 3 \cdot 10^{-5}$	0,039	21,8
	$4 \cdot 10^{-2} + 2 \cdot 10^{-5}$	0,035	9,4
	$4 \cdot 10^{-2} + 3 \cdot 10^{-5}$	0,033	3,1

^a 100 $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ V(V) ^b Mezcla de enmascarantes

A la vista de los resultados mostrados, para cuantificar la concentración de vanadio en muestras reales será necesario adicionar fluoruro amónico y CDTA de forma que sus concentraciones finales en el matraz sean $4 \cdot 10^{-2}$ M y $3 \cdot 10^{-5}$ M, respectivamente.

Exactitud

Para ello, se han utilizado dos materiales de referencia certificados, el primero de ellos es TMDA-62, ya utilizado en el estudio de interferencias, y suministrado por el Instituto Nacional de Investigación del Agua (NWIR) de Canadá. Éste consistía en una muestra acuosa del lago Ontario, mientras que el otro es una muestra de agua de río (SRM 1643d) suministrado por el “National Institute of Standards & Technology” (Estados Unidos). En la tabla 2.40 ya se mostró la concentración de las especies presentes en TMDA-62, mientras que en la tabla 2.42 se indica la composición del otro material de referencia, SRM 1643d.

Cada muestra, a la que previamente se le añade los enmascarantes en las concentraciones adecuadas, se analiza por triplicado. Los resultados que se obtienen se encuentran en la tabla 2.43. En ésta se muestran los valores de incertidumbre en la determinación, expresados en forma de desviación estándar, así como su exactitud, expresada como error relativo, ε_r . En la última columna se detallan los valores obtenidos para el porcentaje de recuperación.

Desarrollo, optimización y validación de nuevos métodos analíticos

Tabla 2.42. Valores certificados para SRM 1643d.

Metal	[M], $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$	Metal	[M], $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$	Metal	[M], $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$
Aluminio	$127,6 \pm 3,5$	Hierro	$91,2 \pm 3,9$	Calcio	$31,04 \pm 0,50$
Antimonio	$54,1 \pm 1,1$	Litio	$16,50 \pm 0,55$	Magnesio	$7,989 \pm 0,035$
Arsénico	$56,02 \pm 0,73$	Manganeso	$37,66 \pm 0,83$	Potasio	$2,356 \pm 0,035$
Bario	$506,5 \pm 8,9$	Molibdeno	$112,9 \pm 1,7$	Sodio	$22,07 \pm 0,64$
Berilio	$12,53 \pm 0,28$	Níquel	$58,1 \pm 2,7$		
Boro	$144,8 \pm 5,2$	Plata	$1,270 \pm 0,057$		
Cadmio	$6,47 \pm 0,37$	Plomo	$18,15 \pm 0,64$		
Cobalto	$25,00 \pm 0,59$	Selenio	$11,43 \pm 0,17$		
Cobre	$20,5 \pm 3,8$	Talio	$7,28 \pm 0,25$		
Cromo	$18,53 \pm 0,20$	Vanadio	$35,1 \pm 1,4$		
Estroncio	$294,8 \pm 3,4$	Zinc	$72,48 \pm 0,65$		

Tabla 2.43. Resultados obtenidos en el análisis de las muestras de referencia.

Muestra	[V] _{certificada} ($\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)	[V] _{encontrada} ($\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)	ε_r (%)	%R
TMDA-62	108 ($\pm 8,19$)	111,59 ($\pm 3,62$)	3,33	103,3
SRM 1643d	35,1 ($\pm 1,4$)	36,72 ($\pm 2,09$)	4,62	104,6

De los resultados obtenidos en este estudio de validación, podemos concluir que los métodos propuestos para la determinación de V(IV) o V(V) en aguas naturales demuestran ser exactos, precisos, con un amplio intervalo de linealidad (hasta $3 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de V(IV) y V(V)), con límites de detección mejores que la gran mayoría de métodos espectrofotométricos y del mismo orden de magnitud que algunos métodos atómicos y selectivos cuando se emplean los agentes enmascarantes apropiados.

A continuación se indica el procedimiento a seguir para la determinación de V(IV) o V(V) en aguas naturales utilizando los métodos propuestos:

CAPÍTULO 2

A una alícuota de muestra que contenga entre 6,7 y 3.000 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ de V(IV) o entre 10,7 y 3.000 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ de V(V) se le añade, siguiendo el orden que se indica a continuación, la disolución reguladora de acético/acetato (concentración final $4\cdot 10^{-3}$ M), la disolución de dPKBH (concentración final $4\cdot 10^{-4}$ M) y el volumen necesario de etanol para alcanzar un 5% v/v final. Para eliminar el efecto de posibles especies interferentes se adicionan también una disolución de ácido ciclohexano diamino-tetraacético (concentración final $3\cdot 10^{-5}$ M) y otra de fluoruro amónico (concentración final 0,04 M) antes de la adición de los reactivos. Agitar suavemente para que se produzca la reacción de formación del complejo y medir la absorbancia a 374,4 nm para V(IV) o a 395,2 nm para V(V). Calcular la concentración de analito en la muestra a partir de la gráfica de calibrado preparada a tal efecto.

3.3.4. Aplicación a muestras reales

En esta ocasión, y dado que los dos materiales de referencia certificados empleados en el estudio de la exactitud se corresponden con muestras acuosas naturales, se utilizaron los resultados que se obtuvieron tras su análisis en las condiciones optimizadas y que ya se mostraron en la tabla 2.43. A fin de completar el estudio, se calcularon los valores del parámetro t de la distribución de Student para comparar los resultados experimentales con los valores de concentración certificados. Este parámetro adopta un valor de 4,30 para 2 grados de libertad y un nivel de probabilidad del 95%. En el caso de la primera muestra, TMDA-62, el valor que se obtiene para este parámetro es 1,72, mientras que vale 1,34 para SRM 1643d. Como se puede observar, en ambos casos se calculan valores del estadístico t inferiores al tabulado, lo que indica que no existen diferencias estadísticamente significativas entre los resultados experimentales y los valores de referencia certificados. En este sentido, se puede concluir que la metodología desarrollada es aplicable al análisis de muestras reales.

Desarrollo, optimización y validación de nuevos métodos analíticos

3.4. DETERMINACIÓN SIMULTÁNEA DE FORMAS QUÍMICAS DE VANADIO: ESPECIACIÓN DE V(IV) Y V(V).

Como ya se mencionó en el capítulo 1, el vanadio puede encontrarse en sistemas acuáticos naturales en sus dos estados de oxidación superiores (+4 y +5). De éstos, el estado de oxidación superior suele ser el más estable y también el más tóxico. En este sentido, es necesario disponer de métodos analíticos que posean la suficiente sensibilidad como para determinar la concentración de ambas especies cuando se encuentran una en presencia de la otra. Así, aunque técnicas analíticas como la espectroscopía de absorción atómica de llama y horno, o de emisión con plasma acoplado poseen dicha sensibilidad, resultan inapropiadas, ya que tan sólo determinan el contenido total de vanadio en la muestra. Para poder distinguir entre ambos estados de oxidación es necesario que se realice una separación previa de ambas especies antes de proceder a su medida. Esto conduce, en la mayoría de los casos, al desarrollo de métodos bastante complejos y con excesiva manipulación de la muestra. Por tanto, es necesario disponer de métodos analíticos que permitan la determinación de vanadio (IV) y vanadio (V) de un modo rápido, sencillo y con poca o ninguna manipulación de las muestras.

Entre los métodos empleados para llevar a cabo estudios de especiación de vanadio se encuentran los espectrofotométricos. A modo de ejemplo, Ramana y col. emplearon la 2-hidroxiacetofenona para formar los complejos a pH 4 y posteriormente extraerlos en cloroformo para determinar la concentración de V(IV) y V(V) en mezclas²¹⁴. El método presenta una baja sensibilidad, encontrándose los intervalos de concentración entre 1-3 mg·L⁻¹ para V(IV) y entre 1-6 mg·L⁻¹ para V(V). En otras ocasiones se utilizan técnicas quimiométricas para resolver las mezclas, como en los estudios realizados por Abbaspour y Mirzajani²¹⁵. En éstos, los autores aplican mínimos cuadrados parciales (PLS) para resolver las mezclas de los complejos formados entre Rojo de Pirogalol y vanadio en un medio tensioactivo proporcionado por bromuro de

²¹⁴ Ramana Murthy, G.V.; Sreenivasulu Reddy, T.; Brahmaji Rao, S. Extraction and simultaneous spectrophotometric determination of Vanadium (IV) and Vanadium (V) in admixtures with 2-Hydroxyacetophenone Oxime. *Analyst*, 114, 493, 1989.

²¹⁵ Abbaspour, A.; Mirzajani, R. Application of spectral β -correction method and partial least squares for simultaneous determination of V(IV) and V(V) in surfactant media. *Spectrochim. Acta Part A*, 64, 646, 2006.

CAPÍTULO 2

cetiltrimetilamonio (CTAB).

En los estudios que se presentan a continuación se va a desarrollar un método que permita la determinación simultánea de ambas especies de vanadio de un modo rápido, económico y sencillo. Para ello, se cuenta con la información obtenida tras el desarrollo de una nueva metodología que permite determinar la concentración individual de una especie en presencia de la otra. Esto ha sido posible empleando los agentes enmascarantes apropiados.

3.4.1. Aditividad de las absorbancias de complejos de vanadio

En primer lugar, se prepara una disolución que contiene $1 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de V(IV) y otra con la misma concentración pero de V(V) y, tras la adición de los reactivos en las condiciones optimizadas, se miden por triplicado frente al blanco en sus máximos de absorción. Además, cada uno de los complejos formados se mide también a la longitud de onda óptima del otro. De este modo, se obtiene información acerca de la señal registrada para cada complejo a dos longitudes de onda, correspondientes a los máximos de absorción de cada uno de ellos. Con estos datos, es posible calcular los valores de absorptividad molar para cada especie de vanadio en los dos máximos de absorción. Así, los valores que se obtienen son:

$\epsilon^{374}_{\text{V(IV)}} = 1,24 \cdot 10^4 \text{ L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$	$\epsilon^{395}_{\text{V(IV)}} = 1,05 \cdot 10^4 \text{ L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$
$\epsilon^{374}_{\text{V(V)}} = 1,11 \cdot 10^4 \text{ L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$	$\epsilon^{395}_{\text{V(V)}} = 1,32 \cdot 10^4 \text{ L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$

A continuación se prepara una única disolución con $1 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de cada uno y, tras añadir los reactivos en las condiciones optimizadas, se mide por triplicado en los máximos de absorción. De acuerdo con la *Ley de Beer* aplicada a una mezcla de dos componentes, la absorbancia de ésta para cada longitud de onda coincidirá con la suma de las absorbancias de cada uno de los componentes individuales: $A_T = A_1 + A_2 = \epsilon_1 \cdot b \cdot c_1 + \epsilon_2 \cdot b \cdot c_2$ siendo c_1 y c_2 las concentraciones de cada uno de los componentes (V(IV) y V(V) en nuestro caso), b la longitud del camino óptico (se utiliza una cubeta

Desarrollo, optimización y validación de nuevos métodos analíticos

de 1 cm de paso de luz) y ϵ_1 y ϵ_2 las absorptividades molares correspondientes, todo ello medido en el máximo de absorción de uno de los componentes. Del mismo modo se obtiene la expresión para la mezcla cuando se mide en el máximo de absorción del segundo componente. Así, nos encontramos con un sistema de dos ecuaciones en el que las concentraciones de V(IV) y V(V) son las variables a determinar. Para llevar a cabo las correspondientes operaciones matemáticas se desarrolla una hoja de cálculo (Microsoft Excel) en la que se introducen los valores de absorbancia obtenidos y se calcula la concentración de cada una de las especies de vanadio. En la tabla 2.44 se muestran los resultados proporcionados por ésta para las tres disoluciones utilizadas, indicándose entre paréntesis el porcentaje de error cometido. Como se puede observar, los valores que se obtienen para las concentraciones coinciden estrechamente con los que se preparan inicialmente.

Tabla 2.44. Resultados del análisis de las disoluciones iniciales.

Muestra	[V(IV)] _{ini.} mg·L ⁻¹	[V(V)] _{ini.} mg·L ⁻¹	[V(IV)] _{calc.} mg·L ⁻¹	[V(V)] _{calc.} mg·L ⁻¹
1	1,00	0,00	1,00 (0,00%)	0,00 ^a
2	0,00	1,00	0,00 ^b	1,00 (0,00%)
3	1,00	1,00	0,96 (-4,40%)	1,01 (0,78%)

^a No detectado (límite detección V(V): 3,2 µg·L⁻¹) ^b No detectado (límite detección V(IV): 2,0 µg·L⁻¹)

3.4.2. Análisis de mezclas sintéticas

Tras verificar los resultados que se obtienen en el estudio precedente, se comprueba la aplicabilidad del método propuesto para evaluar mezclas de diferente composición en ambas especies de vanadio. En este sentido, se preparan varias disoluciones que contienen V(IV) y V(V) en distintas concentraciones y, tras la adición de los reactivos en las condiciones optimizadas, se miden en los dos máximos de absorción. Los valores de absorbancia obtenidos se introducen en la hoja de cálculo desarrollada al efecto y se calcula la concentración de cada una de las especies de vanadio presentes en las disoluciones.

En la tabla 2.45 se muestra la composición de cada una de las mezclas sintéticas preparadas así como los valores de concentración calculados, indicándose entre paréntesis los errores que se cometen. Como se puede observar, para la concentración

CAPÍTULO 2

de V(IV) éstos oscilan desde -5,6% a 2,8% mientras que para V(V) se encuentran en el rango -4,1% a 4,4%. De nuevo vuelven a obtenerse resultados muy adecuados, lo que pone de manifiesto que el método propuesto resulta aplicable para realizar la especiación de vanadio en los intervalos de concentración estudiados.

Tabla 2.45. Concentraciones de vanadio encontradas en el análisis de mezclas.

Muestra	[V(IV)] _{ini.} mg·L ⁻¹	[V(V)] _{ini.} mg·L ⁻¹	[V(IV)] _{calc.} mg·L ⁻¹	[V(V)] _{calc.} mg·L ⁻¹
1	0,50	0,50	0,47 (-5,61%)	0,52 (4,44%)
2	0,50	0,25	0,50 (0,38%)	0,24 (-4,08%)
3	0,50	0,10	0,48 (-3,79%)	0,10 (1,89%)
4	0,50	0,75	0,49 (-1,75%)	0,75 (0,53%)
5	0,10	0,50	0,10 (2,81%)	0,50 (-0,44%)
6	0,25	0,50	0,26 (2,12%)	0,49 (-1,42%)
7	0,75	0,50	0,72 (-3,74%)	0,49 (-2,70%)

3.4.3. Estabilidad de los complejos

Cuando se estudió la estabilidad de los complejos formados individualmente (ver figura 2.46) se observó que presentaban un comportamiento diferente. Así, mientras que el de V(V) permanecía estable durante al menos 24 horas, la señal para el de V(IV) mostraba un descenso progresivo a partir de 15 horas, indicándose como una causa probable del comportamiento observado la oxidación progresiva de éste último. En este sentido, se estudia la estabilidad de las disoluciones que contienen ambos complejos para comprobar el comportamiento del sistema en estas condiciones. Para ello, se analiza el mismo conjunto de muestras empleado en el estudio precedente cuando han transcurrido 24 horas desde que se mezclan todos los reactivos. En la tabla 2.46 se indican los resultados que se alcanzan y, como se puede observar, todas las muestras presentan el mismo comportamiento: un descenso prácticamente constante en la concentración de V(IV) junto con un aumento proporcional en la concentración de V(V). Estos datos sugieren que, como cabía esperar, en el seno de la disolución tiene lugar probablemente la oxidación progresiva del complejo de V(IV) al correspondiente de V(V). Además, otro dato revelador de la existencia de cambios en cada una de las

Desarrollo, optimización y validación de nuevos métodos analíticos

disoluciones que se estudian es el aumento en la intensidad del color que presentan a medida que transcurre el tiempo. Una vez formados los complejos, y para la misma concentración del catión (V(IV) ó V(V)), las disoluciones que contienen el de V(V) muestran mayor intensidad de color.

En la última columna de la tabla 2.46 se indica también la concentración total de vanadio. Ésta se obtiene como la suma de las concentraciones calculadas para ambas especies en cada una de las muestras. Los valores entre paréntesis indican el error cometido respecto de la concentración total de vanadio que inicialmente contiene cada una. Como se puede observar, los errores cometidos se encuentran en la mayoría de los casos en torno a -3%. Este hecho confirma de nuevo que la causa más probable del comportamiento observado en las mezclas sea la oxidación de V(IV) a V(V).

Tabla 2.46. Análisis de las mezclas transcurridas 24 horas.

Muestra	[V(IV)] _{ini.}	[V(V)] _{ini.}	[V(IV)] _{calc.}	[V(V)] _{calc.}	[V] _{total}
1	0,50	0,50	0,21 (-58,12%)	0,76 (52,18%)	0,97 (-3,0%)
2	0,50	0,25	0,23 (-53,57%)	0,50 (98,31%)	0,73 (-2,7%)
3	0,50	0,10	0,23 (-54,93%)	0,35 (246,74%)	0,58 (-3,3%)
4	0,50	0,75	0,19 (-62,67%)	1,03 (36,80%)	1,22 (-2,4%)
5	0,10	0,50	0,04 (-58,27%)	0,56 (12,31%)	0,60 (0,0%)
6	0,25	0,50	0,14 (-45,83%)	0,62 (24,51%)	0,76 (1,3%)
7	0,75	0,50	0,33 (-55,54%)	0,80 (60,34%)	1,13 (-9,6%)

3.4.4. Verificación del método de especiación

Para llevarlo a cabo se utiliza la muestra TMDA-62, material de referencia certificado cuya composición ya se mostró en la tabla 2.40. Esta muestra ya se ha analizado previamente, indicando los resultados que la concentración certificada para vanadio se corresponde con el estado de oxidación superior. Por tanto, para comprobar la adecuación del método de especiación propuesto se adicionan 50 µg·L⁻¹ V(IV) a la muestra previamente a su análisis. A continuación, se adicionan los agentes enmascarantes y todos los reactivos en las condiciones optimizadas y se analiza por triplicado. Los valores de absorbancia obtenidos en los dos máximos de absorción se

CAPÍTULO 2

introducen en la hoja de cálculo desarrollada al efecto y se calcula la concentración de ambas especies de vanadio en la muestra.

En la tabla 2.47 se indica, además de la concentración calculada para cada una de las especies y entre paréntesis los valores de incertidumbre en la determinación, expresados en forma de desviación estándar, la exactitud, expresada como error relativo, ϵ_r . En la última columna se detallan los valores obtenidos para el parámetro t de la distribución de Student (t_1 y t_2 para V(IV) y V(V), respectivamente), calculados para comparar los resultados experimentales con los valores de concentración certificados. Este parámetro adopta un valor de 4,30 ($n = 2$ y $\alpha = 0,05$) y, como se puede observar, los valores calculados se encuentran por debajo de éste, indicando que no existen diferencias estadísticamente significativas entre los resultados experimentales y los valores de referencia certificados. Además, en ambos casos se cometen errores relativos inferiores al 5%.

Tabla 2.47. Resultados obtenidos en la especiación de TMDA-62.

Conc. Certificada		Conc. calculada		Error (%)		t (95%)	
[V(IV)] ^a , $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$	[V(V)], $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$	[V(IV)], $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$	[V(V)], $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$	ϵ_r	ϵ_r	t_1	t_2
50 ($\pm 1,19$)	108 ($\pm 8,19$)	52,02 ($\pm 7,52$)	110,46 ($\pm 7,07$)	4,04	2,28	0,46	0,60

^a Concentración adicionada

En definitiva, los resultados alcanzados en este estudio muestran la adecuación del método propuesto para realizar la especiación de vanadio no sólo en muestras sintéticas sino también en muestras reales, como se demuestra tras el análisis de TMDA-62.

**CAPÍTULO 3. MONITORIZACIÓN DE VANADIO EN
ECOSISTEMAS ACUÁTICOS MEDIANTE EL ACOPLAMIENTO
DE SISTEMAS DE FLUJO Y TÉCNICAS DE MEMBRANAS
LÍQUIDAS**

CAPÍTULO 3

1. INTRODUCCIÓN

1.1. SISTEMAS DE ANÁLISIS POR INYECCIÓN EN FLUJO (FIA)

1.2. SISTEMAS DE PRECONCENTRACIÓN: MEMBRANAS LÍQUIDAS

2. DESARROLLO EXPERIMENTAL

2.1. MÉTODO AUTOMATIZADO PARA EL ANÁLISIS DE VANADIO EN CONTINUO (FIA)

2.2. DETERMINACIÓN DE TRAZAS DE VANADIO EN AGUAS NATURALES MEDIANTE PRECONCENTRACIÓN CON MEMBRANAS LÍQUIDAS

2.2.1. Ensayos Preliminares

2.2.2. Oxidabilidad del vanadio

2.2.3. Optimización del sistema de membrana líquida

2.2.4. Aplicación a muestras reales

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1. MÉTODO AUTOMATIZADO PARA EL ANÁLISIS DE VANADIO EN CONTINUO (FIA)

3.1.1. Ensayos Preliminares

3.1.2. Pre-optimización Univariante

3.1.3. Optimización Multivariante mediante el Método Símplex Modificado

3.2. DETERMINACIÓN DE TRAZAS DE VANADIO EN AGUAS NATURALES MEDIANTE PRECONCENTRACIÓN CON MEMBRANAS LÍQUIDAS

3.2.1. Ensayos Preliminares

3.2.2. Oxidabilidad del vanadio

3.2.3. Optimización del sistema de membrana líquida

3.2.4. Aplicación a muestras reales

Monitorización de vanadio en ecosistemas acuáticos

En este capítulo, los trabajos realizados, que se presentan a continuación, se llevaron a cabo con un doble objetivo. En primer lugar, para minimizar posibles problemas de contaminación como consecuencia de la manipulación de las muestras, así como para reducir el consumo tanto de muestras como reactivos, se desarrolló un método que permitiera la determinación *in situ* y en continuo de vanadio en muestras salinas mediante el análisis por inyección en flujo, FIA. En segundo lugar, y dado que los niveles de concentración en los que se encuentra el vanadio en muestras salinas son del orden de los $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, era necesario desarrollar un método que tuviera un límite de detección inferior a dichos niveles de concentración para que fuera aplicable al mayor número de muestras reales posible. De este modo, se desarrolló un sistema de membrana líquida de volumen para conseguir la preconcentración del analito, el cual se acoplaba al sistema FIA previamente optimizado para cuantificarlo.

1. INTRODUCCIÓN

Tras el desarrollo de un nuevo método para la determinación de trazas de vanadio en muestras acuosas de modo discontinuo, se procedió a la automatización del mismo utilizando la técnica de análisis por inyección en flujo (FIA). Como ya se mencionó en el capítulo 1 de la presente memoria, esta técnica se basa en la inyección de un determinado volumen de muestra líquida sobre una corriente también líquida que la transporta hasta el detector, donde se produce la medida de alguna propiedad física relacionada con el analito como absorbancia, fluorescencia, potencial eléctrico, etc. De entre las ventajas que presenta esta técnica cabe destacar el volumen de muestra necesario para llevar a cabo el análisis, apenas unos microlitros, lo que supone al mismo tiempo, un descenso apreciable en la cantidad de reactivo que debe utilizarse para que tenga lugar la formación de la especie química que posteriormente será detectada y utilizada para cuantificar al analito. Además, controlando las variables hidrodinámicas del sistema pueden realizarse un gran número de análisis en poco tiempo, hasta 200 muestras/h, obteniéndose una alta reproducibilidad en las medidas. Esto implica que el coste por análisis puede minimizarse notablemente. Por otro lado, con tan sólo pequeñas modificaciones en el sistema es posible realizar el análisis de distintas especies presentes en la muestra o, incluso, se pueden analizar varias especies simultáneamente. En resumen, debido a que esta técnica es rápida, precisa y con gran versatilidad, resulta una herramienta adecuada para el análisis de metales en muestras medioambientales. No obstante, es frecuente encontrar muestras en las que los niveles de concentración de los analitos se encuentran por debajo de los límites de detección del método, como el caso del agua de mar. Además, las interferencias provocadas por la matriz salina pueden complicar aún más los análisis. En estos casos, el empleo de técnicas de separación y preconcentración desempeñan un papel importante. Entre ellas, los sistemas de membranas líquidas están mostrándose como una clara alternativa para la separación y/o preconcentración de metales en muestras acuosas medioambientales.

1.1. SISTEMAS DE ANÁLISIS POR INYECCIÓN EN FLUJO (FIA)

Un sistema FIA sencillo, como el mostrado en la figura 3.1, está formado por los siguientes elementos: una *bomba peristáltica*, encargada de impulsar, a velocidad generalmente constante, la corriente transportadora por el interior de un tubo capilar; una *válvula de inyección*, insertada en el tubo capilar, cuya función es la de permitir la introducción de un volumen conocido y bien definido de muestra en el canal transportador; y un *tubo de reacción*, en el que el bolo de muestra puede experimentar procesos tales como mezclas, separación o formación de un compuesto coloreado cuya absorbancia puede ser medida al pasar por el detector. Aunque ésta puede hacerse directamente, con frecuencia se recurre al registro de picos, cuya altura está relacionada con la concentración del analito. El tiempo que transcurre desde que se inyecta la muestra hasta que se alcanza el máximo del pico, que es el que se utiliza como señal analítica, se denomina tiempo de residencia, durante el cual tiene lugar la mezcla y reacción química entre el analito y el reactivo transportador.

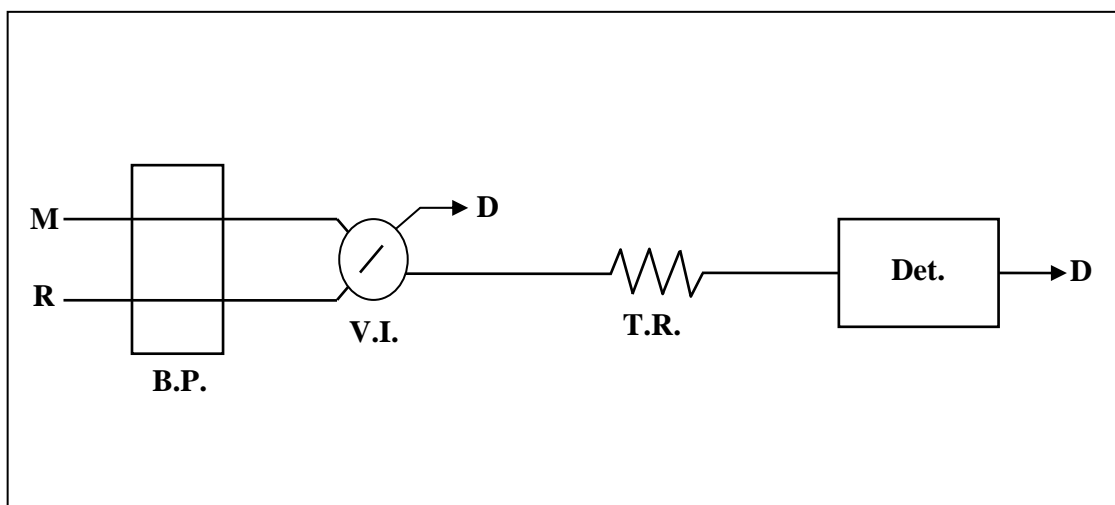


Figura 3.1. Representación esquemática de los componentes de un sistema FIA típico. M canal de muestra; R canal de reactivo; V.I. válvula de inyección; T.R. tubo de reacción; Det. detector y D desechos.

A partir de esta configuración básica, se han desarrollado sistemas más complejos en los que se introducen, por ejemplo, canales adicionales para el transporte de otros reactivos, otras válvulas de inyección, baños termostatzados para controlar la temperatura a la que transcurre la reacción, etc. En el capítulo 1 de la presente memoria

CAPÍTULO 3

ya se mencionaron algunos de los trabajos desarrollados para el análisis de vanadio(IV) y vanadio(V) en muestras acuosas, por lo que no se considera necesario volver a hacer referencia de los mismos en este instante.

Optimización de sistemas de flujo

En los sistemas de análisis en flujo generalmente no se alcanza el equilibrio entre la muestra y el reactivo o reactivos con los que se une tras su inyección. Evidentemente, esto provoca dos hechos: en primer lugar, para obtener resultados reproducibles, el sistema debe trabajar en condiciones estables y, en segundo lugar, la magnitud de la señal dependerá del tiempo y bondad de la mezcla, y en su caso reacción, de la muestra con la corriente portadora. Por tanto, resulta de gran importancia llevar a cabo una correcta optimización de las variables tanto físicas como hidrodinámicas que condicionan el funcionamiento del sistema de flujo. Estas variables generalmente son el caudal de la corriente transportadora, la longitud de los tubos reactores que se utilicen y el volumen de muestra inyectada.

1.2. SISTEMAS DE PRECONCENTRACIÓN: MEMBRANAS LÍQUIDAS

Una de las características más destacables de estos sistemas es la simultaneidad de los procesos de extracción y reextracción del analito de interés. Además, seleccionando adecuadamente las condiciones en las que se va a efectuar el proceso, es posible obtener buenas separaciones así como elevados factores de preconcentración. En este sentido, habitualmente se realiza un estudio previo de los procesos de extracción y reextracción por separado, para obtener las condiciones más favorables en las que tienen lugar ambos. Posteriormente, y a partir de los resultados obtenidos, se selecciona el sistema de membrana líquida a emplear y se estudian las condiciones más favorables para que tenga lugar el transporte y preconcentración de la especie de interés. Esta metodología ha sido la empleada en los trabajos que se presentarán a continuación para el transporte y preconcentración de vanadio en muestras de aguas naturales empleando una MLV. Estos estudios tienen como punto de partida los trabajos efectuados previamente por Palet y col. para el transporte de vanadio(V) a través de una MLS

Monitorización de vanadio en ecosistemas acuáticos

empleando Aliquat 336 como transportador²¹⁶. En éstos, los autores obtuvieron previamente las condiciones óptimas para la extracción (pH 5) y posterior reextracción (pH>8) de vanadio(V) empleando Aliquat 336. A partir de esos datos, alcanzaron las condiciones más favorables para que tuviera lugar el transporte del analito a través de la membrana. Lozano y col. también han estudiado las condiciones más favorables para el transporte de vanadio(V) a través de MLS²¹⁷. En esta ocasión, los autores emplearon la mezcla de Alamine 336 y Cyanex 923 como transportador, y el análisis de la superficie de respuesta para la optimización de las variables que determinaban el transporte. Al igual que en los trabajos de Palet y col.²¹⁶, emplearon una disolución acuosa de amoníaco como disolución receptora. Una disolución receptora poco habitual, carbonato sódico, se empleó en los estudios realizados por Chaudry y col. para recuperar el vanadio(V) transportado a través de una MLS de tri-octilamina²¹⁸. Todos los trabajos mencionados hasta el momento estaban enfocados hacia el estudio de las condiciones más favorables para que tuviera lugar el transporte de vanadio(V). También, aunque en menor número, se han desarrollado sistemas de membranas líquidas para el transporte y preconcentración de vanadio(IV). Así, se pueden mencionar los llevados a cabo por Juang y Lo empleando dEHPA como transportador en una MLS²¹⁹ o los efectuados por Yadav y Mahajani, también con dEHPA como transportador, pero en esta ocasión en una MLE²²⁰.

Como se puede observar, no se han encontrado en la bibliografía trabajos en los que el transporte de vanadio(IV) o vanadio(V) se haya estudiado empleando los sistemas de membranas líquidas de volumen. No obstante, y como se mencionó en el capítulo 1 de esta memoria, entre las posibles configuraciones que pueden adoptar estos sistemas, los de membrana líquida de volumen se caracterizan, entre otras, por su

²¹⁶ Palet, C.; Muñoz, M.; Hidalgo, M.; Valiente, M. Transport of vanadium(V) through a tricaprylmethylammonium solid supported liquid membrane from aqueous acetic acid/acetate solutions. *J. Membr. Sci.*, 98, 241, 1995.

²¹⁷ Lozano, L.J.; Godínez, C.; Alguacil, F.J. Facilitated transport of vanadium(V) by supported liquid membranes. *Hydrometallurgy*, 80, 196, 2005.

²¹⁸ Chaudry, M.A.; Bukhari, N.; Mazhar, M.; Tazeen, F. Vanadium(V) ions transport through tri-n-octyl amine cyclohexane supported liquid membranes. *Sep. Purif. Technol.*, 54, 227, 2007.

²¹⁹ Juang, R.S.; Lo, R.H. Kinetics of the coupled transport of vanadium(IV) from sulphate solutions through supported liquid membranes. *Ind. Eng. Chem. Res.*, 33, 1011, 1994.

²²⁰ Yadav, S.V.; Mahajani, V.V. Liquid emulsion membrane (LEM) process for vanadium(IV) enrichment: Process intensification. *Sep. Sci. Technol.*, 42, 1283, 2007.

CAPÍTULO 3

simplicidad. Así, empleando esta configuración es posible establecer las condiciones químicas que permitan un transporte óptimo del analito en cuanto a eficiencia y selectividad. En la figura 3.2 se muestra un ejemplo de uno de los diferentes tipos de celdas utilizadas y, más concretamente, el empleado para llevar a cabo los estudios que se presentarán más adelante para la preconcentración de vanadio en muestras acuosas.

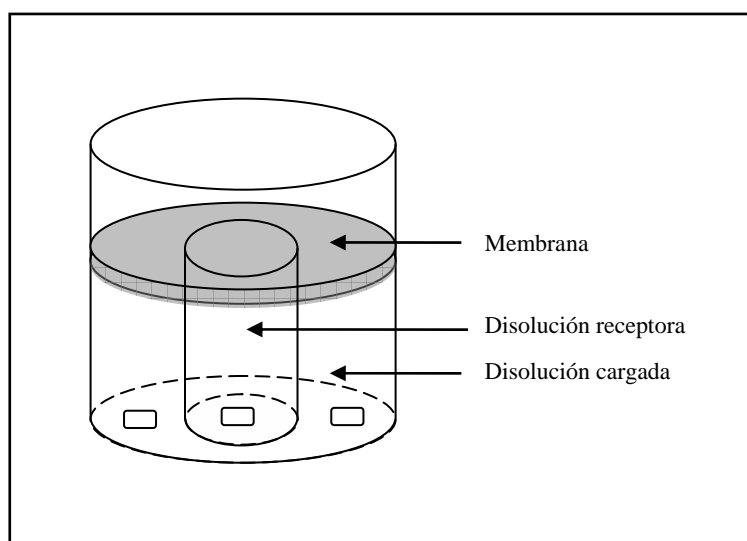


Figura 3.2. Sistema de membrana líquida de volumen.

Como se puede observar, se trata de dos vasos concéntricos en los que se depositan sendas fases acuosas (la receptora en el interior y la muestra en el exterior) teniendo lugar el contacto entre ambas a través de una disolución orgánica que se deposita sobre ellas y que actúa como membrana líquida. El transporte del analito desde la muestra hacia la disolución receptora tendrá lugar a través de la membrana.

2. DESARROLLO EXPERIMENTAL

A continuación se describirán las distintas experiencias llevadas a cabo para alcanzar los objetivos que se han propuesto. En este sentido, se presentarán en primer lugar, y utilizando las condiciones químicas optimizadas para la determinación de vanadio en modo discontinuo, las diferentes variables estudiadas para poner a punto el método utilizando el análisis por inyección en flujo (FIA). A continuación, se describirán las distintas experiencias llevadas a cabo para acoplar el sistema FIA desarrollado a un sistema de membrana líquida de volumen (MLV), el cual permite la preconcentración de este metal en muestras acuosas.

2.1. MÉTODO AUTOMATIZADO PARA EL ANÁLISIS DE VANADIO EN CONTINUO (FIA)

Tras el desarrollo del método en modo discontinuo, se procedió a la automatización del mismo utilizando la técnica de análisis por inyección en flujo (FIA).

En la figura 3.3 se muestra de manera esquemática el sistema FIA estudiado.

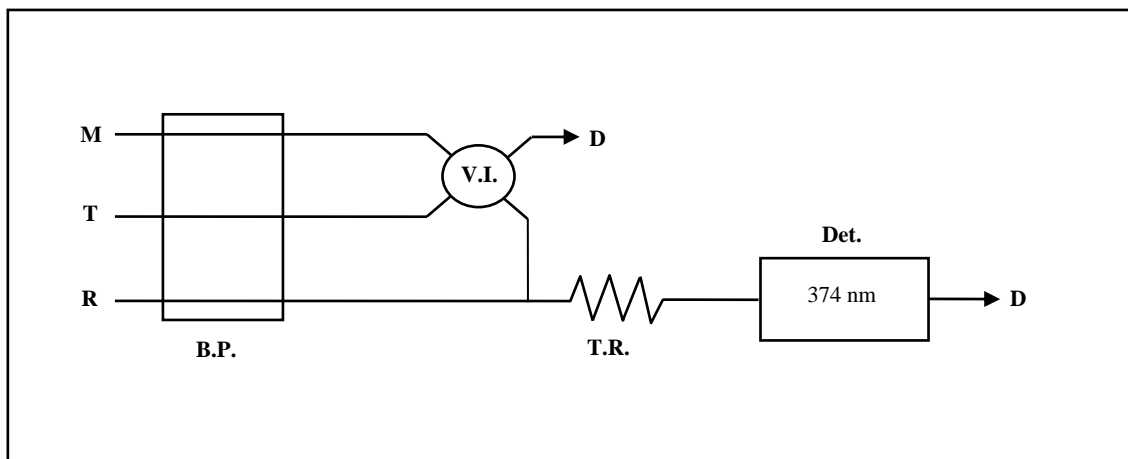


Figura 3.3. Representación esquemática del sistema FIA estudiado. B.P: Bomba Peristáltica; V.I: Válvula de Inyección; T.R: Tubo de reacción; M: Muestra; R: Reactivo ($[dPKBH] = 7,0 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$; $[NaAc/HAc] = 0,1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$; 5% etanol); T: Transportador (agua desionizada); Det.: Detector; D: Desechos.

Como se puede observar, éste estaba formado por tres canales por los que circulaban la muestra, un transportador y el reactivo espectrofotométrico, respectivamente. La introducción en este sistema del canal adicional de transportador

CAPÍTULO 3

surgió como consecuencia del posterior acoplamiento del sistema FIA desarrollado al de membrana líquida de volumen. En este sentido, dado que el objetivo último de este estudio era el desarrollo de un sistema acoplado FIA-MLV, se consideró adecuado utilizar un tercer canal desde el inicio del mismo, que debería tener una composición similar a la de la disolución a inyectar.

El reactivo FIA utilizado consistía en una disolución que contenía todos los reactivos necesarios para que tuviera lugar la formación del complejo de vanadio con dPKBH en las condiciones optimizadas por el método en discontinuo.

La optimización del sistema se abordó en dos etapas. La primera de ellas se realizó mediante una metodología univariante, utilizándose los resultados a modo de estudio de preoptimización, y para compararlos con los obtenidos mediante la segunda, realizada con una metodología multivariante, mediante la utilización del método simplex modificado (Anexo I).

Las variables a optimizar fueron el volumen de muestra, la longitud del tubo de reacción y el caudal del reactivo transportador. En todos los casos, la muestra contenía $1 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de vanadio, estando la disolución usada como transportador constituida por una mezcla del reactivo espectrofotométrico ($[\text{dPKBH}] = 7,0\cdot 10^{-4} \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$); una disolución reguladora de ácido acético/acetato ($[\text{NaCH}_3\text{COO}/\text{CH}_3\text{COOH}] = 0,1 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$) y un 5% de etanol para asegurar la disolución del dPKBH.

2.2. DETERMINACIÓN DE TRAZAS DE VANADIO EN AGUAS NATURALES MEDIANTE PRECONCENTRACIÓN CON MEMBRANAS LÍQUIDAS

2.2.1. Ensayos Preliminares

Como ya se mencionó en el primer capítulo de la presente memoria, los sistemas de membrana líquida se caracterizan, entre otros aspectos, por la simultaneidad de los procesos de extracción y reextracción del analito de interés. Por tanto, antes de proceder a la implementación de tales sistemas se hace necesario realizar un estudio previo de los procesos de extracción y reextracción por separado. En este sentido, se estudió

Monitorización de vanadio en ecosistemas acuáticos

inicialmente el proceso de extracción. Para llevarlo a cabo, se prepararon distintas disoluciones que contenían $1 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de vanadio y diferente contenido salino. A continuación se mezclaba el mismo volumen de éstas con el de una disolución del reactivo orgánico seleccionado, esto es, Aliquat 336 disuelto en dodecano y dodecanol, y se agitaban durante 5 minutos. Una vez separadas ambas fases se medía la concentración de vanadio en la disolución acuosa por espectroscopia de emisión atómica en plasma acoplado inductivamente (ICP-AES). El mismo proceso se realizaba con un blanco del reactivo (disolución que contenía el mismo contenido de dodecano y dodecanol), el cual no extraía vanadio. Posteriormente, se verificó el proceso de reextracción. En esta ocasión, se empleaban alícuotas de disoluciones de amoníaco en nitrato de sodio como reactivo para la reextracción que se agitaban con el mismo volumen de la disolución de Aliquat 336 que contenían el vanadio extraído. Tras cinco minutos de agitación, y una vez separadas ambas fases, se medía la concentración de vanadio en la fase acuosa por ICP-AES.

2.2.2. Oxidabilidad del Vanadio

Después de comprobar la efectividad de ambos procesos, y antes de proceder a la puesta a punto del sistema de membrana líquida de volumen, se planteó la posibilidad de que el vanadio (IV) sufriera un proceso de oxidación en las condiciones estudiadas. Además, en el capítulo 2 de esta memoria ya se había demostrado la existencia de dicho proceso (veánse las figuras 2.47 y 2.48), verificándose que las disoluciones del complejo dPKBH-V(IV) se oxidan al correspondiente complejo de vanadio (V).

En este sentido, si se tiene en cuenta el hecho de que la muestra estará continuamente en agitación en el sistema de membrana líquida, el proceso de oxidación de V(IV) podría verse muy favorecido. Para comprobarlo, se prepararon varias disoluciones que contenían $1 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de V(IV) o V(V) que se mezclaron con el reactivo optimizado para el sistema FIA y se registraron sus espectros.

2.2.3. Optimización del sistema de membrana líquida

Una vez realizados los estudios previos mencionados anteriormente, se comprobó la adecuación del sistema FIA previamente desarrollado para su

CAPÍTULO 3

acoplamiento con el sistema de membrana. Posteriormente, y haciendo uso de la información previamente obtenida al realizar los procesos de extracción y reextracción por separado, se procedió a la optimización de las variables que controlaban el comportamiento del sistema de membrana líquida de volumen. Estas variables fueron el pH de la disolución cargada (muestra) así como de la disolución receptora y la concentración de transportador (Aliquat 336) en la membrana orgánica. En esta ocasión, y dada la alta interdependencia de las variables, se realizó directamente la optimización multivariante mediante el método simplex modificado (Anexo I). La función respuesta que se adoptó para llevar a cabo este estudio fue el coeficiente de permeabilidad, P , de la membrana, el cual se definirá posteriormente.

Otra variable a considerar en estos sistemas es la velocidad de agitación, ya que afectará a los procesos de la capa de difusión, y por tanto el transporte de la especie de interés puede verse favorecido en mayor o menor extensión, condicionando igualmente el tiempo necesario para alcanzar un determinado nivel de preconcentración del analito. Por tanto, con las variables ya optimizadas se realizaron distintas experiencias en las que se varió la velocidad de agitación para encontrar la más adecuada.

2.2.4. Aplicación a muestras reales

Una vez optimizadas todas las variables que influían en el sistema, para verificar la adecuación del nuevo método analítico desarrollado, se analizó un material de referencia certificado (TMDA-62).

Posteriormente, éste se aplicó para determinar el contenido de vanadio en muestras acuosas de diferente composición.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1. MÉTODO AUTOMATIZADO PARA EL ANÁLISIS DE VANADIO EN CONTINUO (FIA)

Una vez optimizadas las variables químicas que afectan a la formación del complejo de vanadio con dPKBH utilizando un método espectrofotométrico para llevar a cabo su medida en muestras acuosas, se describen a continuación los resultados obtenidos para la optimización y aplicación de éste mediante el análisis por inyección en flujo.

3.1.1. Ensayos Preliminares

Antes de proceder a la optimización del sistema, se realizaron una serie de estudios preliminares encaminados a comprobar el efecto que podía producir la introducción del canal adicional transportador en las condiciones químicas previamente optimizadas. En este caso, por dicho canal se hizo pasar agua bidestilada, eligiéndose el diámetro interno de todos los tubos (muestra, agua bidestilada y reactivo) de tal manera que el efecto de dilución que pudiera provocarse fuera el mínimo posible. Así, para los canales de muestra y transportador se seleccionó el tubo más pequeño disponible, cuyo diámetro interno era de 0,127 mm, mientras que el reactivo circulaba por un canal de 2,05 mm de diámetro interno. En estas condiciones, el sistema FIA quedó configurado como se mostró en la fig. 3.3, estando el reactivo FIA basado en las condiciones seleccionadas como óptimas en el estudio discontinuo ($[dPKBH] = 4,0 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$; $[HAc/NaAc] = 4,0 \cdot 10^{-3}$ y 5% de etanol). En estas condiciones se realizaron diversas inyecciones de una disolución que contenía $1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ de vanadio y se procedió a la lectura espectrofotométrica del complejo formado midiendo la absorbancia en el máximo de la altura del pico que se obtenía. Las condiciones a las que se realizaron estas experiencias fueron las siguientes: volumen de muestra: 123 μL ; longitud del tubo de reacción: 1,23 m y caudal de salida: $2,02 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$. Los valores de absorbancia obtenidos fueron muy bajos, lo cual quedaba justificado al comprobar que el pH de la mezcla se encontraba en torno a 8, muy alejado del valor óptimo (4,7). Por tanto, resultaba necesario aumentar la concentración final de disolución reguladora en el

CAPÍTULO 3

reactivo FIA para asegurar que la medida se realizaba en las condiciones de acidez adecuadas. Para ello, se prepararon distintas disoluciones de reactivo FIA en las que se mantenía constante la concentración final de dPKBH y etanol, y se aumentaba progresivamente la de disolución reguladora. Tras su reacción con la disolución de vanadio en el sistema FIA, se recogía un volumen adecuado de la mezcla y se medía el pH de la misma. De este modo, se encontró que era necesaria una concentración final de HAc/NaAc $0,1 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ en la disolución de reactivo FIA para que la formación del complejo tuviera lugar en las condiciones de acidez previamente optimizadas.

A continuación se realizaron nuevas medidas espectrofotométricas con las condiciones anteriormente descritas y utilizando la nueva concentración de disolución reguladora. De nuevo volvieron a obtenerse valores de absorbancia relativamente bajos, lo cual suponía un inconveniente en cuanto a la sensibilidad del método. En esta ocasión, y dado que las condiciones de acidez eran las adecuadas, el efecto de dilución provocado por el canal de agua bidestilada sobre el reactivo FIA podía justificar este hecho. Para tratar de obtener una mejor sensibilidad, se prepararon distintas disoluciones de reactivo FIA en las que se aumentaba la concentración final de dPKBH manteniendo constantes el porcentaje de etanol (5%) y la concentración final de disolución reguladora ($0,1 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$). Con estas disoluciones, y manteniendo las condiciones hidrodinámicas descritas anteriormente, se medía la absorbancia del complejo formado con la disolución de vanadio. Los resultados que se obtuvieron mostraron que una concentración final $7\cdot 10^{-4} \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ de dPKBH en el reactivo FIA proporcionaba los mejores resultados.

En resumen, debido a la introducción del canal adicional de transportador se origina una dilución del sistema, para cuya compensación la disolución de reactivo FIA tendrá una concentración final $7\cdot 10^{-4} \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ de dPKBH y $0,1 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ de disolución reguladora acético/acetato.

3.1.2. Pre-optimización Univariante

Como ya se mencionó al principio de este capítulo, las variables que se estudiaron fueron el volumen de muestra inyectada, la longitud del tubo de reacción y el caudal del reactivo transportador. A continuación se describen los resultados obtenidos.

Volumen de muestra

El volumen de muestra que se inyecta en un sistema FIA está directamente relacionado con la cantidad de analito que se introduce en el sistema. Es por lo tanto un parámetro clave, pues, junto con otras variables tanto químicas como físicas, será responsable de la concentración de la especie absorbente que se forme, y por lo tanto de la magnitud de la señal registrada. El estudio se llevó a cabo variando el volumen de muestra inyectado entre 66 μL y 750 μL , manteniendo invariable el caudal de reactivo ($2,4 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$) y la longitud del tubo de reacción (1,73 m). Cada punto experimental se calculó como el valor medio de al menos tres medidas repetidas, estimándose la precisión, en forma de desviación estándar y representada en la gráfica por las líneas verticales, para cada uno de ellos.

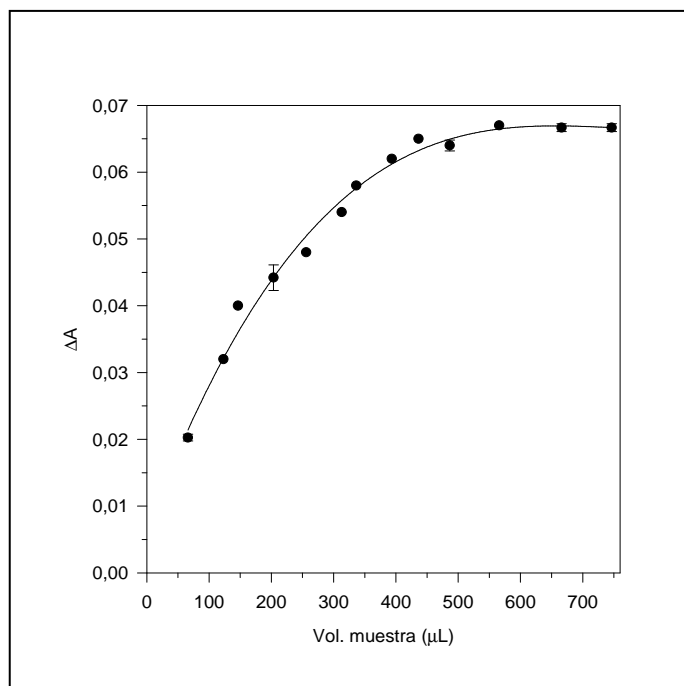


Figura 3.4. Optimización del volumen de muestra. Caudal: $2,4 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$; Longitud del tubo de reacción: 1,73 m. ($[\text{V}]=1 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$; $[\text{dPKBH}]=7,0\cdot 10^{-4} \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$; $[\text{HAc/NaAc}]=0,1 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$; 5% de etanol). $\Delta A = A_{\text{complejo}} - A_{\text{blanco}}$.

En la figura 3.4 se muestran los resultados que se obtuvieron, observándose el comportamiento que habitualmente presenta este tipo de sistemas. Es decir, un rápido aumento de la absorbancia del complejo con el volumen de muestra inyectado hasta que

CAPÍTULO 3

se alcanzan unas condiciones en las que ésta se hace independiente de la cantidad de muestra inyectada.

En nuestro caso, dicha tendencia se mantenía hasta un volumen superior a 500 μL , valor a partir del cual la respuesta se hace independiente del volumen de muestra, eligiéndose en este caso 566 μL como valor óptimo para experimentos posteriores.

Longitud del tubo de reacción

Este parámetro está directamente relacionado con el tiempo durante el cual, la muestra y la disolución de reactivo se ponen en contacto para producir el complejo, cuya señal analítica se determinará posteriormente. Para realizar la optimización de este parámetro se procedió de manera análoga al anterior, manteniendo constante el caudal de reactivo ($2,4 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$), y con el volumen de muestra previamente optimizado, es decir, 566 μL . En estas condiciones, la longitud del tubo se varió entre 1 y 4 m, mostrándose los resultados en la figura 3.5. Igual que en el apartado anterior, las barras verticales indican la precisión de las medidas que se efectuaron, expresadas como la desviación estándar de tres inyecciones sucesivas.

De los resultados obtenidos se observa que la absorbancia del complejo era prácticamente independiente de la longitud del tubo de reacción. No obstante, para longitudes del tubo cada vez mayores se producía un ligero descenso de la señal, como cabía esperar, debido al aumento de la dispersión. Ésta aumenta con la raíz cuadrada de la distancia recorrida provocando un descenso en la altura del pico y por tanto una pérdida de sensibilidad. Por otra parte, la precisión que se alcanzó para las distintas longitudes ensayadas fue similar. Por tanto, y al objeto de conseguir una mayor frecuencia de muestreo, se seleccionó como óptimo el tubo de reacción de menor longitud, es decir, 1m.

Monitorización de vanadio en ecosistemas acuáticos

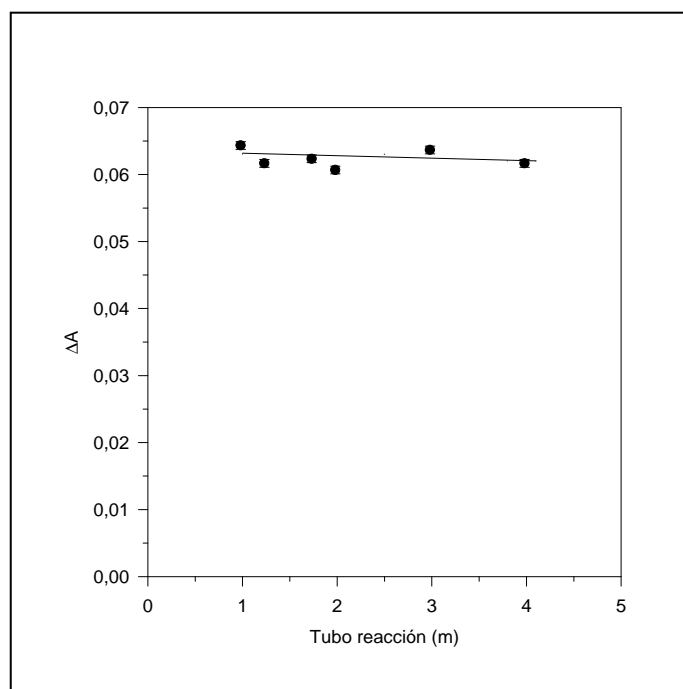


Figura 3.5. Optimización de la longitud del tubo de reacción. Caudal: $2,4 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$. Volumen de muestra: $566 \mu\text{L}$. Resto de condiciones como en la figura 3.4.

Caudal del transportador

Para la pre-optimización de esta variable se mantuvieron constantes, y en los valores previamente optimizados, el volumen de muestra ($566 \mu\text{L}$) y la longitud del tubo reactor (1 m), mientras que el caudal de la disolución de reactivo se varió entre $1,6 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ y $6,6 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$. En la figura 3.6 se muestran los resultados obtenidos, e igual que en los casos precedentes, las barras indican la precisión de los datos para cada una de las velocidades ensayadas. Como puede observarse, la absorbancia del complejo aumenta progresivamente con un aumento del caudal hasta $5,2 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$, donde se obtiene la máxima señal. En estas condiciones, la mezcla entre la muestra y el reactivo se produce en óptimas condiciones, por lo que si se continúa aumentando el caudal, dicha mezcla no mejora, observándose una estabilización de la señal analítica o incluso una ligera disminución como consecuencia de una mayor dispersión del bolo de muestra, así como el menor tiempo de reacción.

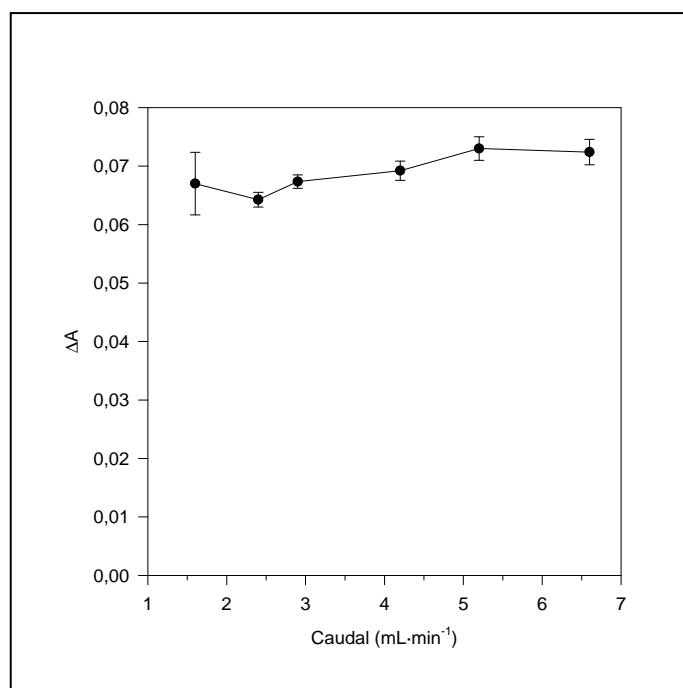


Figura 3.6. Optimización del caudal de la corriente transportadora. Volumen de muestra, 566 μL . Longitud del tubo reactor, 1 m. Resto de condiciones como en la figura 3.4.

En resumen, las mejores condiciones obtenidas mediante el proceso de pre-optimización univariante fueron las siguientes: volumen de muestra: 566 μL ; longitud del tubo de reacción: 1 m; caudal del transportador: 5,2 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$.

A continuación se describirán los estudios realizados mediante optimización multivariante, los cuales partirán de los resultados obtenidos en el estudio univariante, y nos permitirán establecer experimentalmente el óptimo de nuestro sistema de determinación en continuo.

3.1.3. Optimización Multivariante mediante el Método Símples Modificado

Para llevar a cabo la optimización simultánea de las variables que controlaban el comportamiento del sistema FIA se utilizó el método símplex modificado, el cual se describe detalladamente en el Anexo I de esta memoria.

Con este método se optimizaron de manera simultánea las tres variables hidrodinámicas que controlaban el comportamiento del sistema FIA, esto es, el volumen de muestra, la longitud del tubo de reacción y el caudal del transportador. Así, a partir

Monitorización de vanadio en ecosistemas acuáticos

de los valores obtenidos para cada una de las variables tras la pre-optimización univariante, se definieron las condiciones iniciales para obtener los vértices correspondientes al primer símplex. A continuación, se establecieron como función respuesta, la absorbancia media obtenida al realizar las medidas por cuadruplicado, y como criterio para finalizar el símplex, el de las variaciones de las medidas de las respuestas (ver Anexo I), concluyéndose éste cuando las variaciones entre las respuestas de los vértices se deban sólo a errores aleatorios. Para realizar esta estimación se obtenía el valor del estadístico F para la relación entre la varianza de cada símplex y la varianza general del método FIA. Esta última se calculó experimentalmente midiendo cuatro disoluciones con el mismo contenido de vanadio ($1 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$), utilizando las condiciones pre-optimizadas anteriormente. El resultado obtenido fue: $s^2 = 4,0\cdot 10^{-6}$. Con este valor de varianza y el correspondiente a cada símplex se calculaban los distintos valores de F y se comparaban con el valor teórico ($F = 1,72$ para un nivel de probabilidad del 67% ($p = 0,67$) y tres grados de libertad ($V_1 = V_2 = 3$), como se muestra en la tabla 1, Anexo I). El proceso de evaluación finalizó cuando para un determinado símplex la relación entre las varianzas fue menor que el valor teórico, encontrándose las condiciones óptimas en aquel experimento cuya respuesta fue la más alta de entre los 4 que componían el símplex en ese momento.

Una vez establecidas las condiciones en las que se iba a llevar a cabo el proceso de optimización multivariante, se comenzaron a realizar las distintas experiencias. Así, en la tabla 3.1 se muestran los valores para cada una de las variables de los 4 experimentos que constituían el símplex inicial.

Tabla 3.1. Valores del símplex inicial. V: volumen de muestra; L: longitud del tubo de reacción; Q: caudal del transportador.

Vértice	V (μL)	L (m)	Q ($\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$)
1	141	1,86	1,04
2	141	2,11	2,26
3	191	1,86	2,26
4	191	2,11	1,04

CAPÍTULO 3

Tras la realización de los mismos, y aplicando las reglas del método símplex modificado para la obtención de las coordenadas del siguiente vértice (ver Anexo I), se realizaron los experimentos que se muestran en la tabla 3.2.

Tabla 3.2. Resultados de la optimización símplex para las variables que controlan el sistema. I: Símplex inicial; R: Reflexión; E: Expansión; C⁻: Contracción negativa.

Vértice	V (μL)	L (m)	Q (mL·min ⁻¹)	A	Tipo
1	141	1,86	1,04	0,034	I
2	141	2,11	2,26	0,027	I
3	191	1,86	2,26	0,043	I
4	191	2,11	1,04	0,043	I
5	208	1,78	0,62	0,044	R
6	241	1,61	-1,04	-----	E
7	252	1,97	1,58	0,050	R
8	308	2,03	1,85	0,052	E
9	280	2,09	-0,76	-----	R
10	213	1,92	1,72	0,049	C ⁻
11	295	1,71	1,75	0,054	R
12	347	1,51	2,12	0,056	E
13	371	1,86	3,18	0,056	R
14	471	1,68	3,03	0,064	R
15	600	1,56	3,69	0,070	E
16	571	1,26	4,13	0,069	R
17	681	1,61	5,22	0,075	R
18	848	1,66	6,77	0,079	E
19	975	1,13	6,54	0,076	R
20	1044	1,64	7,21	0,073	R
21	1311	1,39	9,99	0,079	R

Monitorización de vanadio en ecosistemas acuáticos

Tabla 3.2. Continuación.

Vértice	V (μL)	L (m)	Q (mL·min ⁻¹)	A	Tipo
22	1045	1,15	8,32	0,081	R
23	1046	0,90 ⁽¹⁾	8,88	-----	E
24	1161	1,67	10,16	0,072	R
25	1022	1,26	7,46	0,074	C ⁻
26	1404	0,77 ⁽¹⁾	10,41	-----	R
27	987	1,46	7,68	0,071	C ⁻
28	1207	1,41	9,87	0,077	R

A: Absorbancia. ⁽¹⁾ Longitud mínima del tubo de reacción 0,98 m.

En la tabla 3.3 se muestran los experimentos que componen cada símplex, los valores medios de la absorbancia, A_s , así como de la varianza, s_s^2 , calculados para cada uno en el proceso de optimización.

Tabla 3.3. Progreso del símplex. A_s : absorbancia media del símplex; S_s^2 : Varianza del símplex.

Nº símplex	Experimentos	A_s	S_s^2	F (S_s^2 / s^2)
1	1, 2, 3 y 4	0,037	$6,02 \cdot 10^{-5}$	15,05
2	1, 3, 4 y 5	0,041	$2,20 \cdot 10^{-5}$	5,50
3	1, 3, 5 y 8	0,043	$5,42 \cdot 10^{-5}$	13,55
4	1, 5, 8 y 10	0,045	$6,22 \cdot 10^{-5}$	15,55
5	5, 8, 10 y 12	0,050	$2,56 \cdot 10^{-5}$	6,40
6	8, 10, 12 y 13	0,053	$1,16 \cdot 10^{-5}$	2,90
7	8, 12, 13 y 15	0,058	$5,49 \cdot 10^{-5}$	13,72
8	12, 13, 15 y 16	0,062	$5,63 \cdot 10^{-5}$	14,08
9	13, 15, 16 y 18	0,068	$8,89 \cdot 10^{-5}$	22,22
10	15, 16, 18 y 19	0,073	$2,56 \cdot 10^{-5}$	6,40
11	15, 18, 19 y 20	0,074	$1,82 \cdot 10^{-5}$	4,55
12	18, 19, 20 y 21	0,077	$8,25 \cdot 10^{-6}$	2,06
13	18, 19, 21 y 22	0,079	$4,25 \cdot 10^{-6}$	1,06
14	18, 21, 22 y 25	0,078	$8,92 \cdot 10^{-6}$	2,23
15	21, 22, 25 y 27	0,078	$8,92 \cdot 10^{-6}$	2,23

CAPÍTULO 3

Como se puede observar, en el *símplex* 13 el valor F calculado (1,06) fue menor que el teórico (1,72), lo cual indicaba que las variaciones de las respuestas surgían como consecuencia de errores aleatorios y, por tanto, se había alcanzado el máximo. Dado que éste estaba formado por los experimentos 18, 19, 21 y 22 y que el valor más alto de absorbancia (función respuesta) se obtuvo para el experimento 22, se realizaron algunos experimentos adicionales para asegurar que se habían alcanzado las condiciones óptimas. Tras confirmar los resultados, las condiciones óptimas seleccionadas fueron las correspondientes a dicho experimento:

Volumen de muestra: 1045 μL

Longitud del tubo de reacción: 1,15 m

Caudal del transportador: 8,32 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$.

Las condiciones óptimas que se alcanzaron mediante el método *símplex* dieron lugar a valores de absorbancia un 12% superiores a los obtenidos mediante la pre-optimización univariante. Esta mejora en la sensibilidad se basa fundamentalmente en valores más altos del volumen de muestra inyectada y del caudal, lo que repercute negativamente en algunos aspectos tales como:

1°. El volumen de inyección de muestra era prácticamente el doble (1045 μL frente a 566 μL), lo que puede ser un inconveniente para pequeños volúmenes de muestra disponibles.

2°. El caudal del transportador también era mayor (8,32 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$ frente a 5,2 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$), lo cual se traducía en un mayor consumo de reactivos y, por tanto, en un mayor coste por análisis, así como en una mayor generación de residuos.

En este sentido, dado que la mejora de la señal analítica obtenida por el método *símplex* no es excesivamente alta y que el sistema FIA optimizado se empleará para su posterior acoplamiento con el de membrana líquida de volumen, se seleccionaron las condiciones optimizadas por el método univariante para realizar los estudios posteriores.

3.2. DETERMINACIÓN DE TRAZAS DE VANADIO EN AGUAS NATURALES MEDIANTE PRECONCENTRACIÓN CON MEMBRANAS LÍQUIDAS

Con los estudios descritos hasta el momento, hemos cubierto la determinación de vanadio presente en muestras acuosas en concentraciones del orden de los $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$. Sin embargo, el vanadio presente en aguas naturales se encuentra a niveles de concentración inferiores, por lo que se hace necesaria su preconcentración previa a la medida. En este sentido, los sistemas de membranas líquidas se muestran como una elección adecuada, ya que permiten la separación y preconcentración de metales bajo condiciones controladas en muestras medioambientales.

Para llevar a cabo este estudio se utilizó el sistema de membrana que se muestra en la figura 3.6 para la preconcentración de vanadio y el sistema FIA previamente desarrollado, y que se mostraba en la figura 3.3, para la cuantificación del mismo.

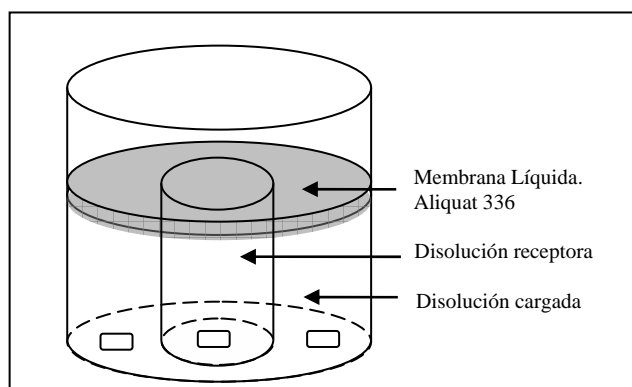


Figura 3.6. Sistema de membrana utilizado para la preconcentración de vanadio.

Como puede observarse, éste consta de dos vasos concéntricos en los que se depositan sendas disoluciones acuosas. Así, en el vaso exterior, con un volumen de 39 mL, se deposita la muestra (disolución cargada), mientras que en el interior, de 24 mL de capacidad, se deposita la disolución receptora. Para que tenga lugar el transporte de analito, ambas fases acuosas se agitan magnéticamente y se cubren con la disolución del reactivo orgánico que actúa como membrana. El volumen de este último ha de seleccionarse de manera que, siendo lo más pequeño posible, cubra completamente ambas disoluciones acuosas para que se produzca el transporte del analito de interés. En

CAPÍTULO 3

nuestro caso, se utilizó un volumen de 7 mL de una disolución de Aliquat 336 disuelto en dodecano y dodecanol.

Concepto de Permeabilidad

Cuando se produce la transferencia de una determinada especie química a través de membranas líquidas es necesario cuantificar el transporte realizado en dicho proceso para poder evaluar de este modo la eficacia del mismo. Dicha cuantificación se realiza evaluando el flujo de materia, J , que tiene lugar a través de la membrana líquida durante un determinado período de tiempo. La expresión que define el flujo temporal de materia como consecuencia del gradiente existente viene regida por la ley de Fick, y puede plantearse como:

$$J = - \frac{d[M]_f}{dt} \cdot \frac{V_f}{Q}$$

donde $[M]_f$ representa la concentración del metal en la disolución cargada, V_f el volumen de la misma y Q el área efectiva de la membrana.

Habitualmente, este flujo de materia se suele expresar mediante otro parámetro relacionado con él como es el caso de la permeabilidad, P , la cual se define como el cociente entre el flujo y la concentración de la especie de interés en la disolución cargada. Es decir, $P = \frac{J}{[M]_f}$. Si se sustituye esta expresión en la anterior se obtiene:

$$P = - \frac{1}{[M]_f} \cdot \frac{d[M]_f}{dt} \cdot \frac{V_f}{Q}$$

e integrando se llega a la expresión:

$$-\ln[M]_f = \frac{Q}{V_f} \cdot P \cdot t - \ln[M]_{f,0}$$

Monitorización de vanadio en ecosistemas acuáticos

De este modo, representando la variación de $-\ln [M]_f$ frente al tiempo se obtendrá una relación lineal de cuya pendiente puede calcularse el valor de la permeabilidad (que vendrá expresada en unidades de $\text{cm}\cdot\text{min}^{-1}$) para cada uno de los procesos de transporte.

A continuación se describen los resultados obtenidos para la puesta a punto de un método de preconcentración de vanadio en muestras salinas mediante un sistema de membrana líquida de volumen y su posterior medida espectrofotométrica utilizando el método de análisis por inyección en flujo previamente optimizado.

3.2.1. Ensayos Preliminares

Como ya se ha mencionado a lo largo de esta memoria, los sistemas de membranas líquidas están basados en la simultaneidad de los procesos de extracción y reextracción, cuyo resultado final es el transporte del analito de interés desde la disolución cargada hasta la receptora, donde posteriormente se cuantifica. Por tanto, antes de proceder a la optimización de estos sistemas es necesario comprobar ambos procesos por separado. Para ello, en nuestro caso se partirá de los estudios realizados por Palet y col.²¹⁴, como ya se ha señalado en la introducción de este capítulo. En este sentido, se realizaron ensayos en discontinuo en los que se utilizó una disolución cargada que contenía $1 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de vanadio a pH 5 y diferente contenido salino para el proceso de extracción y una disolución receptora $0,1 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ de NH_4OH en NaNO_3 $0,6 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ a la que se variaba el pH entre 9 y 12 para el proceso de reextracción. La composición de esta última se seleccionó de manera que igualase la fuerza iónica de la disolución con mayor salinidad, la cual se utilizó para llevar a cabo los experimentos de reextracción. En todos los casos se utilizó como fase orgánica una disolución $0,15 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ de Aliquat 336 disuelto en dodecano y con un 3,5% v/v final de dodecanol.

El proceso de extracción se realizó tomando, por duplicado, alícuotas de 5 mL de cada una de las disoluciones de vanadio y se adicionaban en un tubo de extracción en el que se mezclaban con 5 mL de la disolución de Aliquat 336 o de dodecano con un 3,5% v/v final de dodecanol, para obtener de cada ensayo su blanco de extracción correspondiente. A continuación se agitaban los tubos manualmente durante cinco

CAPÍTULO 3

minutos y, una vez separadas ambas fases, se realizaba la medida de la fase acuosa mediante espectroscopia de emisión atómica de plasma acoplado inductivamente (ICP-AES). En la tabla 3.4 se muestran, en primer lugar, los resultados obtenidos en el proceso de extracción. Como se puede observar, para todas las disoluciones ensayadas se obtuvieron porcentajes de extracción del metal similares, en torno al 80%, lo que ponía de manifiesto el adecuado funcionamiento de este proceso y su práctica independencia respecto del contenido salino.

Tabla 3.4. Resultados de la extracción de $1 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de vanadio.

Salinidad ($\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ NaCl)	$[\text{V}]_{\text{f}}$ ($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$) ^a	% Ext.
0	0,164	83,6
1	0,159	84,1
10	0,165	83,5
25	0,211	78,9
35	0,219	78,1

^a concentración final en la fase acuosa.

Por lo que respecta al proceso de reextracción, en la figura 3.7 se muestran los resultados que se obtuvieron utilizando la disolución orgánica empleada para la extracción del metal con un contenido de $35 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ NaCl. En esta ocasión, y al objeto de disponer de un volumen adecuado de disolución orgánica, se realizó previamente la extracción de 50 mL de la disolución acuosa de vanadio con el mismo volumen de la disolución de Aliquat 336. Una vez separadas ambas fases, se conservó la disolución orgánica para realizar la reextracción. La metodología seguida en este proceso fue similar a la de la extracción, tomándose alícuotas de 5 mL de la disolución orgánica que se mezclaban con el mismo volumen de disolución 0,1 M de NH_4OH en NaNO_3 0,6 M a pH comprendidos entre 9 y 12. Tras agitar manualmente durante cinco minutos y dejar separar ambas fases, se procedía a la medida de las disoluciones acuosas resultantes por ICP-AES. Como puede observarse, la recuperación del analito se desarrolla adecuadamente, aumentando de forma progresiva con el pH de la disolución receptora hasta que éste llega a 11, donde se obtiene la máxima eficacia y, por tanto, las

Monitorización de vanadio en ecosistemas acuáticos

condiciones más adecuadas para la reextracción. Por tanto, una vez verificados ambos procesos en discontinuo podía procederse al estudio del funcionamiento acoplado del sistema de membrana líquida.

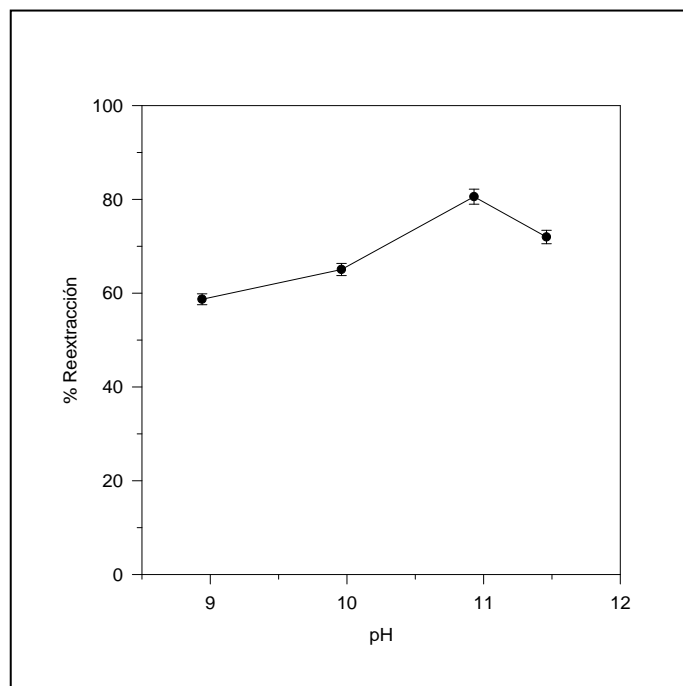


Figura 3.7. Variación del porcentaje de reextracción con el pH de la disolución receptora.

3.2.2. Oxidabilidad del Vanadio

Para ello, se prepararon disoluciones acuosas de NH_4OH 0,1 M en NaNO_3 0,6 M que contenían la misma cantidad de V(IV) y V(V) ($1 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$). Dichas disoluciones se adicionaron en un matraz de 10 mL y se mezclaron con la disolución de reactivo optimizada en el método FIA para formar los complejos correspondientes, ya que ésta sería la utilizada en el sistema acoplado con la membrana líquida de volumen. Inmediatamente después de mezclar las disoluciones se registraron los espectros de los complejos formados frente a un blanco preparado exactamente de la misma forma pero en ausencia de vanadio. En la figura 3.8 se muestran dichos espectros y, como se puede observar, ambos son idénticos, presentando una banda ancha de absorción entre 375 y 400 nm. A partir de este instante, todas las medidas se realizan a 375 nm.

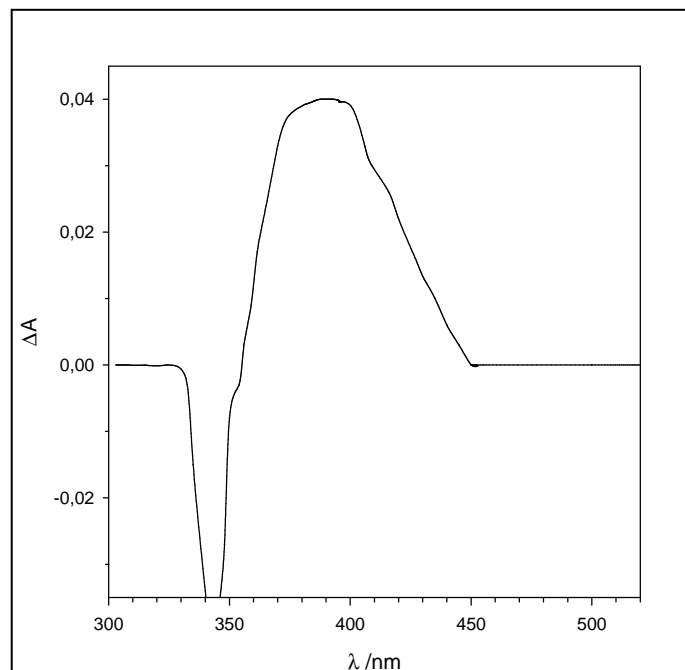


Figura 3.8. Espectros dPKBH-V. $[V(IV)] = [V(V)] = 1 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$; NH_4OH 0,1 M + NaNO_3 0,6 M; Reactivo ($[\text{dPKBH}] = 7\cdot 10^{-4} \text{ M}$, 5% EtOH); pH 4,7

Por tanto, los resultados obtenidos demuestran que las condiciones experimentales en las que se llevan a cabo las medidas provocan la formación de un complejo entre dPKBH y vanadio en el que este último actúa con su estado de oxidación más elevado, es decir, V(V). Estas mismas conclusiones se alcanzan en algunos trabajos consultados en la bibliografía realizados con otros agentes extractantes como por ejemplo los ya mencionados de Zhou Nan²²¹. En éstos se indicaba que la reacción que tenía lugar entre V(IV) y N-benzoíl-N-fenilhidroxilamina (BPHA) en un medio ligeramente ácido producía la formación de un quelato de V(V). Ejemplos de este mismo comportamiento pueden encontrarse en los trabajos realizados por M.J.C. Taylor y col.²²¹, entre otros. En todos ellos, el producto de reacción que se obtenía cuando se estudiaban los sistemas utilizando V(IV) era un quelato de V(V).

²²¹ Taylor, M.J.C.; Marshall, G.D.; Williams, S.J.S.; van Staden, J.F.; Saling, C. The determination of vanadium(V) in the presence of vanadium(IV) using 4-(2-pyridylazo)resorcinol in a flow-injection manifold. *Anal. Chim. Acta*, 329, 275, 1996.

Monitorización de vanadio en ecosistemas acuáticos

Este hecho pone de manifiesto la posibilidad de cuantificar la concentración total de vanadio en muestras salinas, tanto procedente de especies en las que éste presenta valencia IV como V utilizando para ello este método. De hecho, dentro de la metodología analítica puede usarse indistintamente V(IV) y V(V). Para comprobarlo, se preparó una recta de calibrado empleando disoluciones en las que se varió la concentración de V(IV) entre 0 y 2 mg·L⁻¹ y a continuación se midieron distintas disoluciones preparadas exactamente de la misma forma pero con diferentes concentraciones de V(V). Los resultados que se obtuvieron en todos los casos presentaron errores inferiores al 5%.

3.2.3. Optimización del sistema de membrana líquida

El dispositivo utilizado para llevar a cabo el proceso de preconcentración de vanadio se mostró en la figura 3.6. Éste estaba formado por dos vasos concéntricos, en el más externo se introducían 39 mL de la muestra (disolución cargada), mientras que en el interno se situaban 24 mL de una disolución amoniacal que actuaba como disolución receptora. Para que tuviera lugar el proceso de transporte se adicionaban 7 mL de una disolución de Aliquat 336 (A336) disuelto en dodecano y dodecanol sobre la superficie de ambas disoluciones acuosas, que actuaba como membrana líquida.

Todos los ensayos se realizaron agitando simultáneamente ambas disoluciones acuosas mediante un agitador magnético. Debido a la menor densidad de la disolución orgánica empleada respecto del agua, la membrana líquida quedaba en todo momento por encima de ambas disoluciones acuosas, poniéndolas en contacto y posibilitando así el transporte de especies químicas desde la disolución cargada, situada en el compartimento exterior, hasta la receptora, situada en el interior. Además, dada la diferencia de volumen entre ambos compartimentos, de manera simultánea a la separación se conseguía la preconcentración del analito.

Antes de proceder a la optimización del sistema de membrana líquida de volumen, el primer paso en el estudio de separación de cualquier especie química debe consistir en la verificación del funcionamiento simultáneo de los procesos de extracción y reextracción que previamente se habían comprobado por separado. Para ello, se utilizaron las condiciones experimentales que se muestran en la tabla 3.5.

CAPÍTULO 3

Tabla 3.5. Condiciones utilizadas para la verificación del sistema de Membrana Líquida de Volumen.

<u>Disolución Cargada</u>	<u>Membrana</u>	<u>Disolución Receptora</u>
V = 39 mL	V = 7 mL	V = 24 mL
0,5 mg·L ⁻¹ V	0,15 mol·L ⁻¹ A336	0,1 mol·L ⁻¹ NH ₃ /NH ₄ ⁺
35 g·L ⁻¹ NaCl	3,5% v/v dodecanol	0,6 mol·L ⁻¹ NaNO ₃
pH 5	Dodecano	pH 11

Los experimentos se realizaron con agitación simultánea de ambas disoluciones acuosas mediante un agitador magnético a 900 rpm, calculándose la concentración de vanadio periódicamente mediante determinación espectrofotométrica a 375 nm empleando el sistema de análisis por inyección en flujo previamente desarrollado. En la figura 3.9 se muestra el dispositivo experimental empleado.

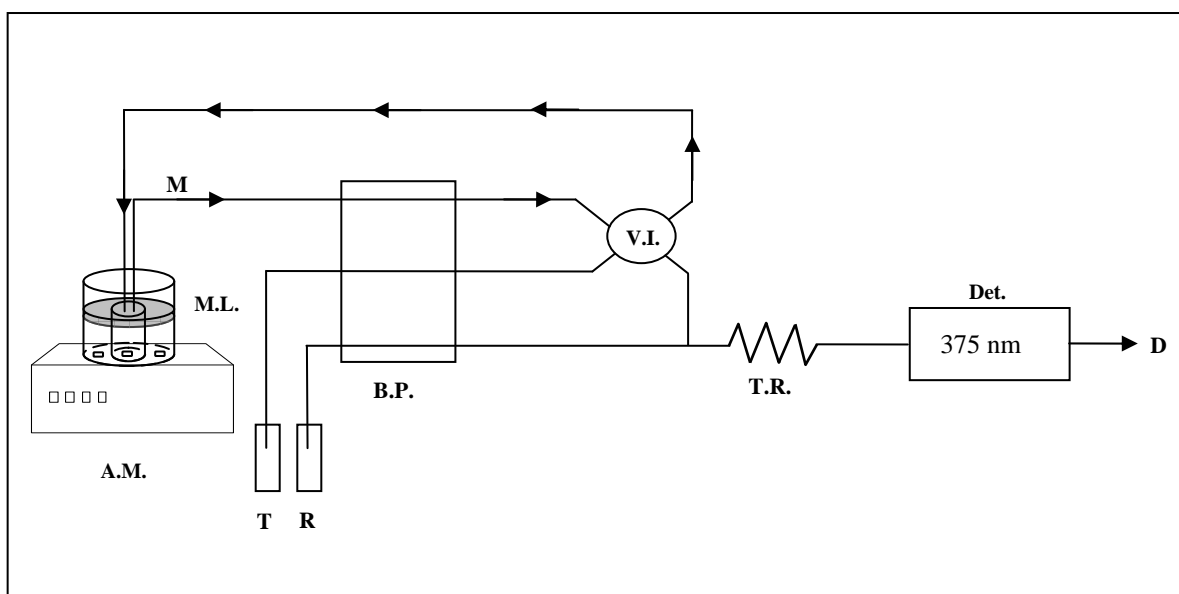


Figura 3.9. Representación esquemática del sistema desarrollado. **A.M.:** Agitador magnético; **M.L.:** Vaso de membrana líquida; **M:** Muestra; **T:** Transportador; **R:** Reactivo ([dPKBH] = $7,0 \cdot 10^{-4}$ mol·L⁻¹; [NaAc/HAc] = 0,1 mol·L⁻¹; 5% etanol); **B.P.:** Bomba peristáltica; **V.I.:** Válvula de inyección; **T.R.:** Tubo de reacción; **Det.:** Detector y **D:** Desechos.

Adecuación del sistema FIA

La optimización de las condiciones hidrodinámicas del sistema FIA se llevó a cabo considerando su posterior adaptación al sistema de membrana líquida de volumen.

Monitorización de vanadio en ecosistemas acuáticos

Como ya se mostró en dicho proceso, con las condiciones óptimas alcanzadas por el método simplex modificado se obtenían señales analíticas ligeramente superiores a las correspondientes tras la optimización univariante. No obstante, a la hora de acoplar el sistema FIA con el de membrana líquida de volumen se hizo necesario adoptar una solución de compromiso con el objetivo de que el consumo de muestra y reactivos fuera lo menor posible. En este sentido, las condiciones hidrodinámicas que se utilizarían para realizar la optimización del sistema de membrana serían las alcanzadas tras la optimización univariante. Por tanto, todos los experimentos posteriores se realizarían utilizando un volumen de muestra de 566 μL , con una longitud del tubo de reacción de 1 m y un caudal de 5,2 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$.

Una vez establecidas las condiciones iniciales, tanto químicas como hidrodinámicas del sistema acoplado, se realizaron los experimentos correspondientes. Para ello, el tiempo transcurrido durante cada experiencia fue de 120 minutos, realizando medidas por duplicado de la absorbancia a 375 nm cada 30. Como se mostró en la figura 3.9, cada vez que se vaya a efectuar una medida será necesario retirar un determinado volumen de la disolución receptora. Para compensar dicha pérdida, es por lo que en el sistema FIA se utilizaba el canal adicional de transportador. Éste tiene una composición idéntica a la disolución receptora del sistema de membrana líquida, por lo que, después de cada inyección de muestra, la disolución que se introduce en el sistema de membrana líquida no produce contaminación alguna, tan sólo la dilución de la disolución receptora. Para compensar el efecto de esta dilución, provocado por la inyección de muestra (566 μL de disolución receptora), se llevó a cabo una corrección matemática mediante una hoja de cálculo (Microsoft Excel), desarrollada a tal efecto, en la que los valores sucesivos de absorbancia obtenidos se multiplicaban por el correspondiente factor de corrección. De este modo, se podía calcular en cada momento la cantidad de analito que quedaba en la disolución cargada y, por consiguiente, el porcentaje del mismo extraído.

Para calcular el valor del coeficiente de permeabilidad (P) se utilizó la siguiente expresión:

$$-\ln[M]_f = \frac{Q}{V_f} \cdot P \cdot t - \ln[M]_{f,0}$$

CAPÍTULO 3

donde Q es el área efectiva de membrana en contacto con la disolución cargada (una corona circular de $10,89 \text{ cm}^2$, en nuestro caso), V_f es el volumen de la disolución cargada (39 mL) y $[M]_f$ y $[M]_{f,0}$ representan las concentraciones de vanadio en la disolución cargada para cada tiempo de medida e inicial, respectivamente.

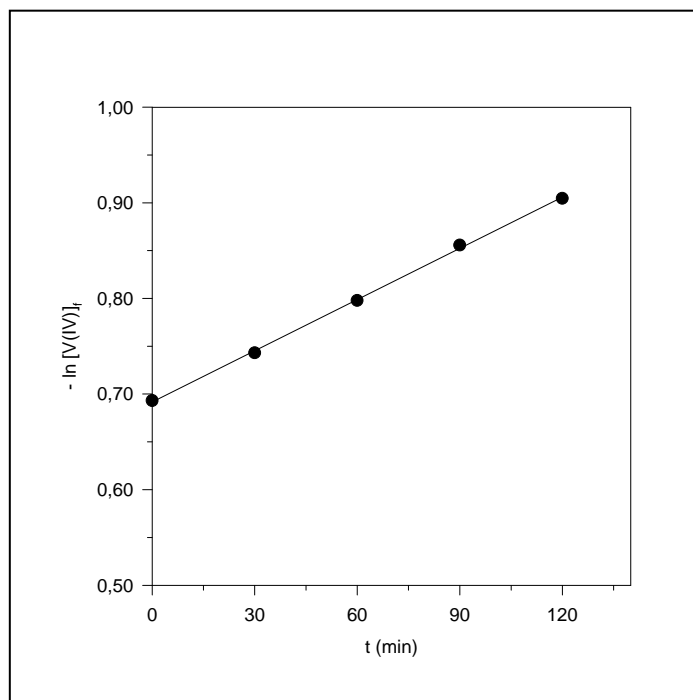


Figura 3.10. Representación gráfica para el cálculo del coeficiente de permeabilidad.

Como se muestra en la figura 3.10, representando la variación de $-\ln [M]_f$ frente al tiempo se obtiene una relación lineal de cuya pendiente puede calcularse el valor del coeficiente de permeabilidad (que vendrá expresada en unidades de $\text{cm}\cdot\text{min}^{-1}$) para cada uno de los experimentos realizados. Así, se obtuvo un valor de $P = 0,0097 \pm 0,0028 \text{ cm}\cdot\text{min}^{-1}$, habiéndose realizado el experimento por cuadruplicado, y verificándose con ello el transporte de vanadio desde la muestra hasta la disolución receptora.

Optimización del sistema de preconcentración de vanadio en agua de mar mediante membranas líquidas de volumen

Una vez verificado el funcionamiento del sistema, se procedió a la optimización de las condiciones químicas del mismo para obtener la mayor eficacia posible en el transporte del ión metálico. Para ello se realizó una estrategia multivariante basada

Monitorización de vanadio en ecosistemas acuáticos

nuevamente en el método símplex modificado (ver anexo I). En esta ocasión, las variables a optimizar fueron el pH de las disoluciones cargada y receptora, así como la concentración del extractante A336. En la tabla 3.6 se muestran los valores para cada una de las variables de los 4 experimentos que constituían el símplex inicial. En todos los casos se utilizaban disoluciones cargadas de $35 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ NaCl y $0,1 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ NaAc que contenían $1 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de vanadio a las que se ajustaba el pH al valor correspondiente a cada experimento. Éstas se depositaban en el compartimento exterior del vaso. Del mismo modo, las disoluciones receptoras, que ocupaban el compartimento interior, consistían en una disolución amoniacal con NaNO_3 $0,6 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ para equilibrar la fuerza iónica, y al valor de pH indicado para cada experimento. Igualmente, las disoluciones que actuaban como membrana se preparaban disolviendo A336 en dodecano a la concentración indicada para cada experiencia, pero siempre con un contenido final de dodecanol de 3,5% v/v.

Tabla 3.6. Valores para cada una de las variables del símplex inicial.

Vértice	pH _{cargada}	pH _{receptora}	[A336], $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$
1	3,5	9,5	0,30
2	3,5	8,5	0,50
3	4,5	8,5	0,30
4	4,5	9,5	0,50

El cálculo del coeficiente de permeabilidad se realizaba obteniendo medidas por duplicado de la absorbancia de la disolución receptora cada 30 minutos durante 2 horas utilizando el sistema FIA acoplado que se mostró en la figura 3.9.

Una vez establecidas las condiciones iniciales, se optó por el criterio de comparación de varianzas utilizando el estadístico F para detener el símplex. Como ya se mencionó, este criterio establece que una vez alcanzado el óptimo las pequeñas variaciones observadas en las respuestas surgen sólo como consecuencia del error aleatorio. Esto se observa matemáticamente cuando el cociente entre la varianza de un determinado símplex y la varianza del método es inferior al valor del parámetro F para un determinado nivel de probabilidad y grados de libertad. En nuestro caso, cada símplex estaba formado por cuatro experimentos y la varianza del método se calculó

CAPÍTULO 3

repitiendo cuatro veces el mismo experimento ($s^2 = 2,97 \cdot 10^{-5}$), por lo que de acuerdo con la tabla 1 del Anexo I, el valor de F para 3 grados de libertad y $p = 0,67$ es 1,72.

Una vez establecidas las condiciones en las que se iba a llevar a cabo el proceso de optimización, se realizaron los experimentos que formaban el símplex inicial y, aplicando las reglas del método símplex modificado para la obtención de las coordenadas del siguiente vértice, se realizaron los experimentos que se muestran en la tabla 3.7.

Tabla 3.7. Resultados de la optimización símplex para las variables que controlan el sistema. I: Símplex inicial; R: Reflexión; E: Expansión; C: Contracción negativa; RE: Reevaluación.

Vértice	pH _{cargada}	pH _{receptora}	[A336], mol·L ⁻¹	P, cm·min ⁻¹	Tipo
1	3,5	9,5	0,30	0,00915	I
2	3,5	8,5	0,50	0,02630	I
3	4,5	8,5	0,30	0,00201	I
4	4,5	9,5	0,50	0,03129	I
5	3,2	9,8	0,57	0,04688	R
6	2,5	10,5	0,70	0,01610	E
7	4,0	9,0	0,75	0,02240	R
8	3,8	9,2	0,64	0,01860	C
9	4,2	10,5	0,64	0,01457	R
10	3,7	9,0	0,53	0,02284	C
11	3,8	9,7	0,43	0,02387	R
12	4,0	10,3	0,47	0,01498	R
13	3,8	9,3	0,52	0,01126	C
14	3,9	9,4	0,63	0,02622	R
15	3,9	9,8	0,61	0,01683	R
16	3,2	9,8	0,57	0,04987	RE5
17	3,9	9,7	0,59	0,01832	R
18	4,5	9,5	0,50	0,02609	RE4

En la tabla 3.8 se muestran los distintos símplex que se fueron formando, indicando los experimentos que componían cada uno de ellos, el valor medio de la

Monitorización de vanadio en ecosistemas acuáticos

función respuesta obtenida (Permeabilidad), la varianza correspondiente a cada símplex así como el valor del estadístico F.

Tabla 3.8. Progreso del símplex. P_m : Permeabilidad media del símplex; S_s^2 : Varianza del símplex.

Nº Símplex	Experimentos	$P_m, \text{cm} \cdot \text{min}^{-1}$	S_s^2	F
1	1, 2, 3 y 4	0,01719	$1,92 \cdot 10^{-4}$	6,46
2	1, 2, 4 y 5	0,02840	$2,42 \cdot 10^{-4}$	8,15
3	2, 4, 5 y 8	0,03077	$1,43 \cdot 10^{-4}$	4,81
4	4, 5, 8 y 10	0,02990	$1,56 \cdot 10^{-4}$	5,25
5	4, 5, 10 y 11	0,03122	$1,23 \cdot 10^{-4}$	4,14
6	4, 5, 11 y 13	0,02832	$2,21 \cdot 10^{-4}$	7,44
7	4, 5, 13 y 14	0,02891	$2,16 \cdot 10^{-4}$	7,27
8	4, 13, 14 y 16	0,02966	$2,54 \cdot 10^{-4}$	8,55
9	14, 16, 17 y 18	0,03012	$1,87 \cdot 10^{-4}$	6,30

Los resultados de esta tabla muestran que el valor más pequeño obtenido para el cociente entre las varianzas (4,14) estaba aún alejado del valor crítico (1,72) que permite parar el símplex. No obstante, observando las condiciones que se muestran en la tabla 3.7 para cada uno de los experimentos, se puede comprobar cómo a partir del experimento 12 las variaciones que se producen para cada una de las variables son muy pequeñas. Este hecho nos hacía pensar que el sistema podía encontrarse en la región de máxima respuesta. Para verificar esta hipótesis se procedió a realizar la representación gráfica de las curvas de respuesta que se obtenían cuando se relacionaban dos a dos cada una de las variables que controlaban el sistema. En este sentido, en la figura 3.11 se muestra la curva de respuesta que se obtuvo para la Permeabilidad en función del pH de las disoluciones cargada y receptora. Como se puede observar, ésta presenta una cresta, que coincide con la máxima Permeabilidad, y que se corresponde con los valores de pH para las disoluciones cargada y receptora que indicaba el experimento 5 del símplex ($\text{pH}_{\text{cargada}} = 3,2$ y $\text{pH}_{\text{receptora}} = 9,8$).

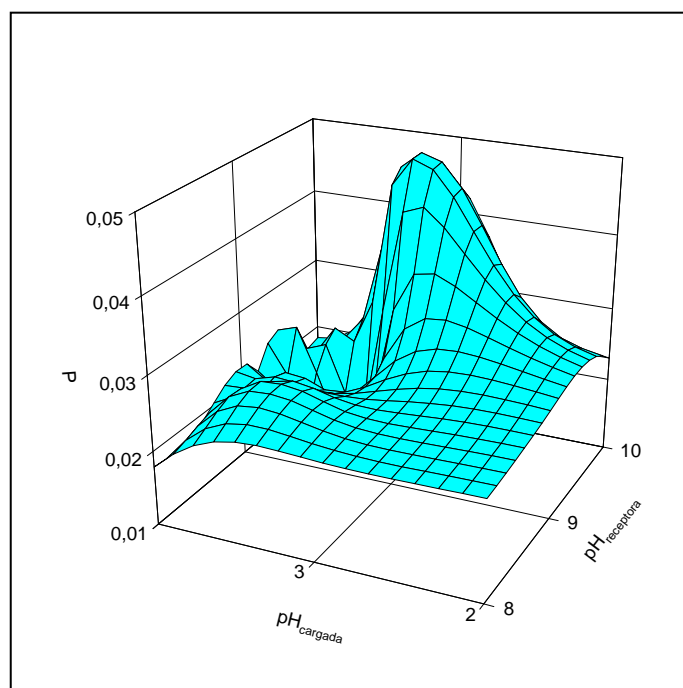


Figura 3.11. Superficie de respuesta obtenida para la Permeabilidad en función del pH de la disolución cargada ($\text{pH}_{\text{cargada}}$) y receptora ($\text{pH}_{\text{receptora}}$).

En la figura 3.12 se presenta una gráfica similar, en la que en esta ocasión se muestra la curva de respuesta obtenida cuando se representaba la concentración molar de la disolución utilizada como membrana (A336) frente al pH de la disolución cargada. Igual que para el caso anterior, las condiciones para las que se obtiene la máxima Permeabilidad coinciden con las del experimento 5 del simplex para estas variables ($\text{pH}_{\text{cargada}} = 3,2$ y $[\text{A336}] = 0,57 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$). Asimismo en esta figura podemos observar cómo, en las condiciones estudiadas, la concentración de extractante es la variable que menos afecta a la permeabilidad del sistema.

Monitorización de vanadio en ecosistemas acuáticos

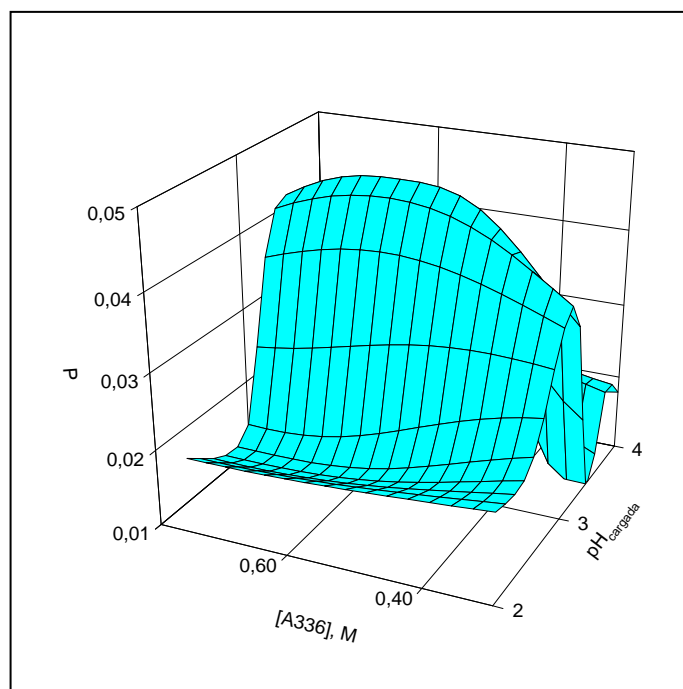


Figura 3.12. Superficie de respuesta obtenida para la Permeabilidad en función del pH de la disolución cargada ($\text{pH}_{\text{cargada}}$) y la concentración de la disolución de la membrana (A336).

Por último, en la figura 3.13 se representan las otras dos variables que restaban por comparar, el pH de la disolución receptora y la concentración de la disolución utilizada como membrana. De nuevo volvían a confirmarse los resultados obtenidos en los casos precedentes, obteniéndose el valor máximo de Permeabilidad para las condiciones que indicaba para estas variables el experimento 5 del simplex ($\text{pH}_{\text{receptora}} = 9,8$ y $[\text{A336}] = 0,57 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$).

Así pues, como en un principio parecía desprenderse de los resultados obtenidos, podemos detener el proceso de optimización sin cometer errores significativos, siendo atribuible el incumplimiento del test F-Fischer a la baja varianza del sistema de separación, anomalía ésta muy frecuente en sistemas de alta reproducibilidad. Por tanto, de los resultados obtenidos se puede concluir que las condiciones químicas óptimas para el sistema de membrana estudiado se corresponden con las indicadas por el experimento

CAPÍTULO 3

5 del simplex: $\text{pH}_{\text{cargada}} = 3,2$; $\text{pH}_{\text{receptora}} = 9,8$ y $[\text{A336}] = 0,57 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$. De aquí en adelante, todas las experiencias se llevarían a cabo utilizando dichas condiciones.

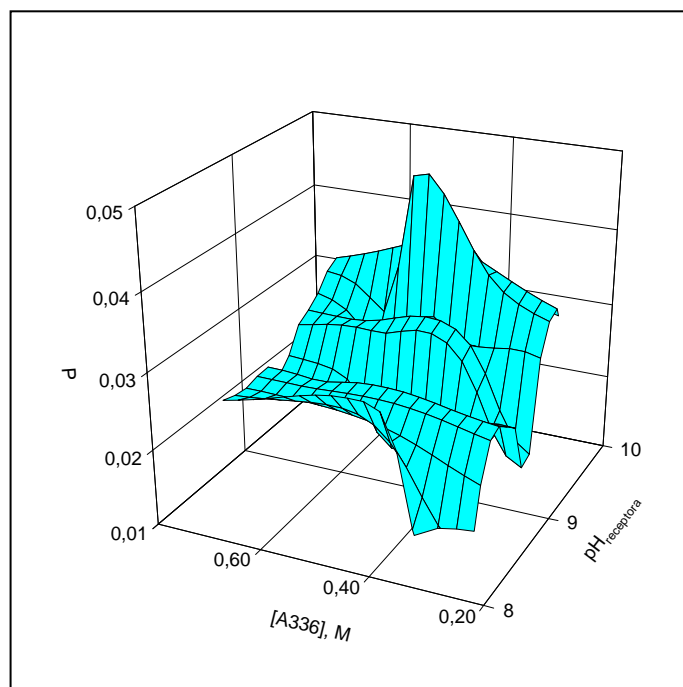


Figura 3.13. Superficie de respuesta obtenida para la Permeabilidad en función del pH de la disolución receptora ($\text{pH}_{\text{receptora}}$) y de la disolución utilizada como membrana (A336).

En esta ocasión, como se ha comentado, el criterio de comparación de las varianzas no se utilizó para determinar el momento en el que se podía detener el simplex. Sin embargo, sí podía utilizarse otro de los criterios que permite llegar a tal fin, como es el de establecer una distancia mínima entre los vértices (Anexo I). Según este criterio, a medida que el sistema va progresando hacia las condiciones óptimas, las coordenadas de los sucesivos vértices estarán cada vez más próximas. Por tanto, se puede definir un límite inferior para el cambio de éstas tomando una fracción del tamaño de paso original. En este sentido, teniendo en cuenta que las condiciones de partida para establecer los cuatro experimentos que componían el simplex inicial fueron las que se muestran en la tabla 3.9, si se adoptase como criterio para detener la búsqueda una variación del 10% del tamaño de paso original de las variables, el resultado sería idéntico.

Monitorización de vanadio en ecosistemas acuáticos

Tabla 3.9. Condiciones iniciales para las tres variables del símplex.

Variable	Valor inicial	Paso
pH _{cargada}	4	1
pH _{receptora}	9	1
[A336], mol·L ⁻¹	0,40	0,20

De los datos que se mostraban en la tabla 3.7 se observa que para los experimentos 13, 14 y 15 se cumplía el último criterio adoptado para las distintas variables. Así, en el símplex número 7 que se mostraba en la tabla 3.8 ya se habrían alcanzado las condiciones óptimas. Dado que éste estaba formado por los experimentos 4, 5, 13 y 14 y que de ellos, el experimento 5 era el que mostraba el valor más alto de Permeabilidad, las condiciones establecidas por éste para cada una de las variables se consideraron las óptimas. Estos resultados confirman los que ya se han descrito previamente mediante las representaciones gráficas de las curvas de respuesta. Por tanto, las condiciones químicas a las que se efectuarán las siguientes experiencias serán:

$$\text{pH}_{\text{cargada}} = 3,2$$

$$\text{pH}_{\text{receptora}} = 9,8$$

$$[\text{A336}] = 0,57 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$$

Velocidad de agitación

Una vez optimizadas las condiciones químicas del sistema de preconcentración, se procedió a estudiar la influencia de la velocidad de agitación, utilizándose para ello las condiciones optimizadas anteriormente. Se realizaron diversas experiencias en las que se varió la velocidad de agitación entre 500 y 1.000 rpm. En cada una de ellas se calculó el valor del coeficiente de Permeabilidad del sistema realizando medidas por duplicado de la absorbancia de la disolución receptora cada 30 minutos durante dos horas. Los resultados obtenidos, que se muestran en la figura 3.14, indicaban un aumento progresivo de la Permeabilidad del sistema con la velocidad de agitación hasta 900 rpm. Cuando se ensayaron velocidades superiores se observó que a los pocos

CAPÍTULO 3

minutos de comenzar la experiencia se producía la rotura de la membrana provocando la mezcla de ambas disoluciones acuosas.

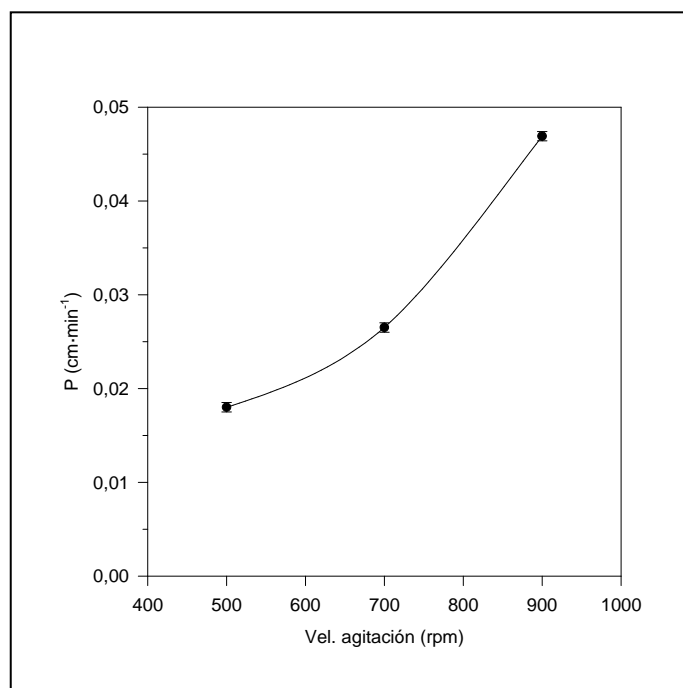


Figura 3.14. Influencia de la velocidad de agitación.

Por tanto, se seleccionó como velocidad de agitación óptima 900 rpm.

Rendimiento del sistema de membrana líquida

Al objeto de conseguir la máxima eficacia en el proceso de transporte y preconcentración del analito mediante el sistema desarrollado, se estudió el tiempo que era necesario mantener la agitación en el sistema de membrana para alcanzar su máximo rendimiento. Para ello, se estudió la variación en el porcentaje de extracción del analito con el tiempo durante tres horas, realizando medidas espectrofotométricas cada 30 minutos de la disolución receptora resultante mediante el sistema FIA acoplado que se mostraba en la figura 3.9. En este punto hay que indicar que los sucesivos valores de absorbancia obtenidos a partir de la primera medida se corregían para considerar el efecto de dilución que se producía en la disolución receptora. En la figura 3.15 se muestran los resultados obtenidos para los experimentos realizados en condiciones óptimas. Como se puede observar, transcurridos 150 minutos ya se alcanzaba el 100%

Monitorización de vanadio en ecosistemas acuáticos

de extracción-reextracción, lo que puede permitir la utilización del sistema de membrana líquida desarrollado como herramienta de preconcentración de vanadio en muestras salinas con la máxima eficacia. En estas condiciones, y considerando las características del diseño del dispositivo de membrana utilizado, se obtuvo un factor de preconcentración para el vanadio de 1,625, pudiendo éste aumentarse de forma sencilla mediante la variación de los volúmenes de la celda utilizada.

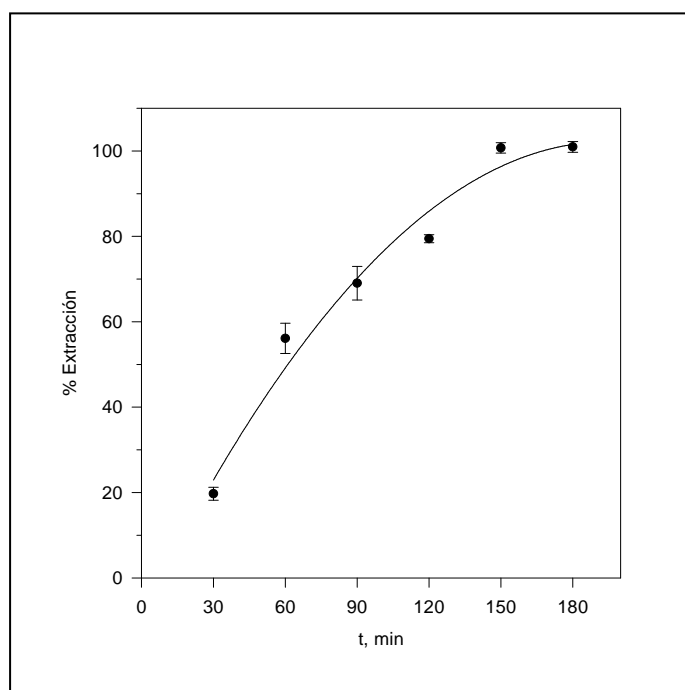


Figura 3.15. Extracción de vanadio en función del tiempo con el sistema de Membrana Líquida de Volumen (MLV).

A continuación se estudió el comportamiento del sistema de preconcentración cuando éste se aplicaba al análisis de muestras reales, ya que en éstas el efecto de la matriz de las mismas podría modificar el tiempo optimizado previamente. En este sentido, se utilizaron tres muestras de agua de mar a las que se les habían adicionado previamente $100 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ de vanadio ajustando posteriormente sus valores de pH a 3,2. A continuación, y al objeto de establecer el tiempo necesario para que el proceso de transporte y preconcentración del analito fuera completo, se realizaron medidas espectrofotométricas de la disolución receptora resultante cada 30 minutos durante 210 minutos utilizando el sistema FIA acoplado. En la figura 3.16 se muestran los resultados

CAPÍTULO 3

que se obtuvieron y, como se puede observar, al cabo de 180 minutos el proceso concluía, obteniéndose un porcentaje de extracción para vanadio de 100%. Estos resultados indicaban, como ya se ha mencionado anteriormente, la necesidad de aumentar el tiempo de agitación del sistema para alcanzar la misma eficacia que con las disoluciones salinas preparadas en el laboratorio. Igualmente, teniendo en cuenta las dimensiones del vaso de membrana utilizado, el factor de preconcentración es 1,625.

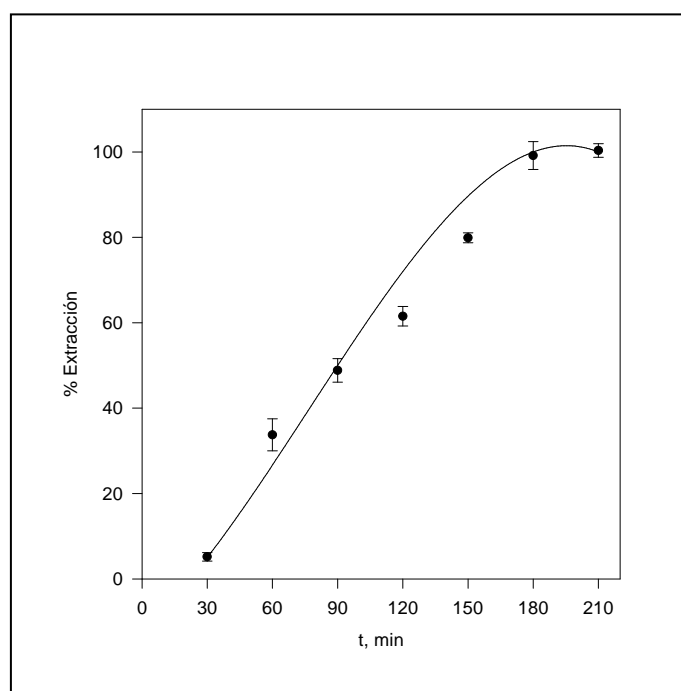


Figura 3.16. Extracción de vanadio en función del tiempo con el sistema de Membrana Líquida de Volumen (MLV) en muestras reales.

Características analíticas del sistema acoplado FIA-MLV

Todos los ensayos se realizaron empleando las condiciones hidrodinámicas optimizadas para el sistema FIA por el método univariante, esto es, un volumen de muestra de 566 μL , un tubo de reacción de un metro de longitud y un caudal para el transportador de $5,2 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$.

En primer lugar se estudió el intervalo de concentración de vanadio para el cual la relación entre ésta y la absorbancia era lineal. En este sentido, se prepararon una serie de disoluciones de amoníaco $0,1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ en nitrato sódico $0,6 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ a las que se

Monitorización de vanadio en ecosistemas acuáticos

variaba la concentración final de vanadio y posteriormente se realizaba su medida espectrofotométrica a 375 nm frente a su blanco correspondiente. Como se muestra en la figura 3.17, éstos presentaban un comportamiento lineal hasta 3 mg·L⁻¹ de vanadio. Dicha concentración marcaba, por tanto, el final del intervalo de aplicabilidad.

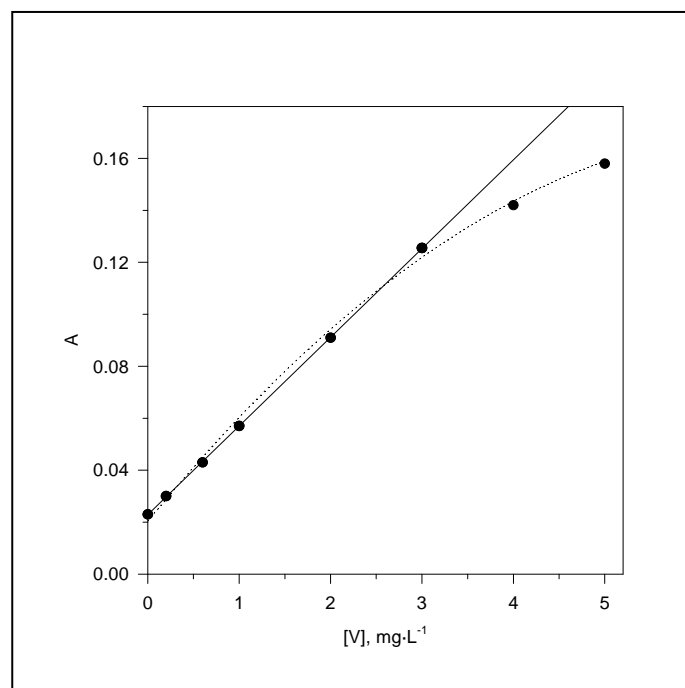


Figura 3.17. Intervalo de linealidad para Vanadio. [dPKBH] = $7,0 \cdot 10^{-4}$ mol·L⁻¹; [NaAc/HAc] = 0,1 mol·L⁻¹; 5% etanol.

En este intervalo, la ecuación de ajuste para la recta de calibrado que regía el comportamiento del sistema tenía la siguiente expresión:

$$A = 0,0341 (\pm 0,0003) [V] + 0,0229 (\pm 0,0005) \quad r^2 = 0,99996$$

En dicha ecuación, los intervalos de confianza para la pendiente y la ordenada en el origen se calcularon como ts_a y ts_b , siendo s_b y s_a las desviaciones estándar relativas para la pendiente y la ordenada en el origen, respectivamente, y t es el parámetro de la distribución de Student para $n-2$ grados de libertad al 95% de confianza ($p = 0,05$).

Posteriormente se procedió al cálculo del límite de detección del método FIA construyendo diversas rectas de calibrado para varios intervalos de concentración de

CAPÍTULO 3

vanadio. En la tabla 3.10 se muestran los parámetros de ajuste de las rectas de regresión obtenidas para los diferentes intervalos estudiados. Cada una de ellas se construyó con al menos cinco puntos, realizándose las medidas por triplicado. Para calcular el límite de detección se utilizó el criterio del cociente entre tres veces la desviación estándar de la ordenada en el origen y la pendiente de la recta, obteniéndose un valor de $8 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ para el sistema FIA desarrollado. Dicho límite de detección se verá disminuido en función del factor de preconcentración alcanzado en la etapa de separación por membrana.

Tabla 3.10. Intervalos de concentración empleados para calcular el límite de detección.

Intervalo ($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$)	Ordenada en el origen	Pendiente	R^2	$^a s_a$	$^a s_b$	L.D. ($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$)
0 – 3	0,0229	0,0341	0,9999	0,0002	0,0001	0,015
0 – 2	0,0132	0,0355	0,9996	0,0004	0,0004	0,034
0 – 1	$6,0\cdot 10^{-5}$	0,0390	0,9999	0,0001	0,0002	0,008

^a s_a y s_b son las desviaciones estándar de la ordenada en el origen y la pendiente, respectivamente.

Por último, se calculó la precisión del método analizando en las condiciones ya optimizadas once disoluciones de hidróxido amónico $0,1 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ en nitrato sódico $0,6 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ que contenían $1 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de vanadio cada una. Los resultados que se obtuvieron se muestran en la figura 3.18. El valor de la desviación estándar relativa para estas condiciones fue 2,72%, lo cual indicaba una buena repetitividad en las medidas y, por tanto, la adecuación del sistema desarrollado.

Monitorización de vanadio en ecosistemas acuáticos

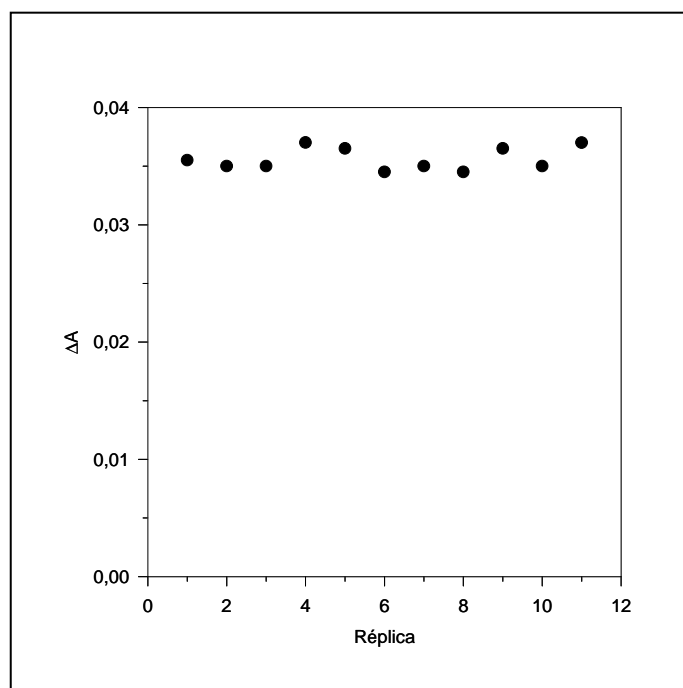


Figura 3.18. Precisión de las medidas.

3.2.4. Aplicación a muestras reales

Una vez que se obtuvieron las condiciones más adecuadas para que tuviera lugar el proceso de preconcentración del ión metálico y su posterior cuantificación mediante el sistema FIA desarrollado, se procedió a verificar su aplicabilidad. En este sentido, en primer lugar se procedió al análisis de un material de referencia certificado al objeto de comprobar su exactitud. Posteriormente, y una vez comprobada la adecuación del método desarrollado, éste se aplicó para cuantificar la concentración de vanadio en muestras de diferente composición.

Como se ha mencionado anteriormente, la exactitud del método se verificó mediante el análisis de un material de referencia certificado, en concreto TMDA-62, suministrado por el Instituto Nacional de Investigación del Agua (NWIR) de Canadá. Éste consistía en una muestra acuosa del lago Ontario, cuyos contenidos de los diferentes elementos traza certificados se muestran en la tabla 3.11.

CAPÍTULO 3

Tabla 3.11. Valores certificados para los elementos de TMDA-62.

Metal	[M], $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$	Metal	[M], $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$	Metal	[M], $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$
Aluminio	$92,3 \pm 15,6$	Cobre	$106 \pm 10,7$	Níquel	$97,8 \pm 8,77$
Antimonio	$57,7 \pm 11,1$	Cromo	$93,0 \pm 9,41$	Plomo	$98,7 \pm 10,9$
Arsénico	$51,7 \pm 7,24$	Estroncio	$117 \pm 10,0$	Selenio	$50,1 \pm 7,37$
Bario	$115 \pm 9,26$	Hierro	$121 \pm 16,5$	Talio	$51,2 \pm 4,30$
Berilio	$53,7 \pm 6,43$	Litio	$56,3 \pm 6,72$	Uranio	$52,1 \pm 4,92$
Cadmio	$89,9 \pm 8,69$	Manganeso	$103 \pm 9,90$	Vanadio	$108 \pm 8,19$
Cobalto	$100 \pm 7,94$	Molibdeno	$97,6 \pm 9,18$	Zinc	$110 \pm 15,5$

De esta muestra se tomaron dos alícuotas diferentes y se analizaron utilizando el sistema acoplado FIA-MLV en las condiciones ya optimizadas. De este modo, transcurridos los 180 minutos necesarios para la preconcentración y separación del analito, se determinó su concentración mediante lectura espectrofotométrica a 375 nm, por triplicado, de la disolución receptora. En la tabla 3.12 se muestran los resultados que se obtuvieron, indicándose además del valor medio para la concentración de vanadio y la incertidumbre asociada a ésta expresada en forma de desviación estándar, el error cometido. Como se puede observar, se obtuvieron excelentes resultados, confirmando así la validez del método desarrollado para la determinación del contenido de vanadio en muestras medioambientales.

Tabla 3.12. Resultados obtenidos del análisis de TMDA-62.

Muestra	[V] _{certificada} , $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$	[V] _{encontrada} , $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$	ϵ_r (%)
TMDA-62	$108 \pm 8,19$	$108,7 \pm 10,2$	0,65

Una vez verificado el método, se procedió a su aplicación para el análisis de muestras diferentes. Para ello, se prepararon inicialmente diversas disoluciones que contenían $35 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ de NaCl en NaAc $0,1 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ y con distintas concentraciones de vanadio ajustando previamente su pH a 3,2. Éstas se ponían en contacto a través de la membrana (la disolución de A336 $0,57 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ disuelto en dodecano y con el 3,5% v/v de dodecanol) con la disolución receptora, que estaba formada por hidróxido amónico $0,1 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ en nitrato sódico $0,6 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ a pH 9,8. En estas condiciones se montaba el

Monitorización de vanadio en ecosistemas acuáticos

sistema de membrana agitando ambas disoluciones acuosas mediante un agitador magnético a 900 rpm durante 150 minutos. Transcurrido este tiempo, se realizaba la correspondiente medida espectrofotométrica a 375 nm con el sistema FIA acoplado. Cada disolución se medía al menos por triplicado, mostrándose los resultados que se obtuvieron tras dividir por el factor de preconcentración del vaso utilizado (1,625), en la tabla 3.13. En ésta aparecen, además de la desviación estándar (s) para las medidas y el error relativo cometido, los valores para el parámetro t de la distribución de Student calculados para comparar los resultados experimentales con los valores de concentración iniciales. Este parámetro adopta un valor de 4,30 para 2 grados de libertad y una probabilidad del 95%. Como se puede observar, en ningún caso se obtuvieron valores superiores al tabulado, lo que indicaba que no existían diferencias estadísticamente significativas entre la media experimental y la concentración inicial. Por tanto, no se apreciaban errores sistemáticos en el sistema desarrollado.

Tabla 3.13. Resultados obtenidos para distintas disoluciones de vanadio con el sistema desarrollado.

[V] _{añadido} , mg·L ⁻¹	[V] _{encontrado} , mg·L ⁻¹	s	ε _r (%)	t
1,000	0,998	0,015	-0,2	0,23
0,430	0,428	0,007	-0,5	0,49
0,170	0,163	0,014	-4,1	0,87

Por último, se realizó la medida de dos muestras de agua de mar procedentes de las bahías de Cádiz y Huelva, respectivamente. De cada una de ellas se tomaron dos réplicas a las que se adicionó la misma cantidad de vanadio que se utilizó anteriormente, esto es, 100 µg·L⁻¹. Cada réplica se sometió al proceso de preconcentración utilizando el sistema de membrana y, transcurridos 180 minutos, se realizaban las correspondientes lecturas espectrofotométricas a 375 nm de las respectivas disoluciones receptoras. Las medidas de absorbancia por triplicado efectuadas se transformaban posteriormente en concentración de vanadio a partir de las ecuaciones de las rectas de regresión preparadas al efecto. Por último, se dividían por el factor de preconcentración del sistema (1,625) para obtener de este modo la concentración de vanadio existente en cada muestra. Para

CAPÍTULO 3

confirmar los resultados obtenidos, también se midieron por espectroscopia de absorción atómica de llama cada una de las réplicas utilizadas. En la tabla 3.14 se muestran los resultados que se obtuvieron tras analizar las muestras por espectroscopia de absorción atómica de llama y mediante el método propuesto. Como se puede observar, para ambas se obtuvieron errores relativos similares cuando se comparó la concentración encontrada por el método con la obtenida mediante FAAS. Además, éstos fueron inferiores al 5%, lo que ponía de manifiesto la adecuación del método acoplado FIA-MLV aquí desarrollado para la cuantificación de vanadio en muestras salinas. Por último, los valores del estadístico t para la comparación de las medias experimentales son inferiores a los tabulados ($t = 2,78$ para $n = 4$ y $\alpha = 0,05$), lo que de nuevo pone de manifiesto la ausencia de diferencias estadísticamente significativas entre las medidas.

Tabla 3.14. Resultados obtenidos en el análisis de vanadio en muestras de agua de mar.

Muestra	V_{añadido} ($\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)	V_{encontrado} ($\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)^a	V_{encontrado} ($\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)^b	ϵ_r (%)	t (95%)
Cádiz	100	132,4 \pm 8,3	126,8 \pm 11,0	- 4,23	0,70
Huelva	100	150,8 \pm 7,4	143,8 \pm 9,4	- 4,64	1,01

^a Medido por FAAS.

^b Este método.

**CAPÍTULO 4. NUEVOS SISTEMAS QUÍMICOS PARA LA
PRECONCENTRACIÓN DE TRAZAS DE COBRE EN
MUESTRAS ACUOSAS. IMPLEMENTACIÓN AL ANÁLISIS ON-
LINE**

CAPÍTULO 4

1. INTRODUCCIÓN

2. DESARROLLO EXPERIMENTAL

2.1. MÉTODO DE DETERMINACIÓN EN CONTINUO

2.2. MÉTODO DE DETERMINACIÓN POR PRECONCENTRACIÓN

2.3. MÉTODO DE PRECONCENTRACIÓN POR TÉCNICAS EXTRACTIVAS MEDIANTE EL USO DE 1,2-CHBBH

2.3.1. Ensayos Preliminares

2.3.2. Extracción de cobre

2.3.3. Reextracción de cobre

2.3.4. Aplicación

2.3.5. Utilización de 1,2-CHBBH como transportador de cobre en sistemas de membranas líquidas

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1. MÉTODO DE DETERMINACIÓN EN CONTINUO

3.1.1. Optimización Univariante

3.1.2. Optimización Multivariante mediante el Método Símplex Modificado (MSM)

3.1.3. Validación del método

3.1.4. Aplicación

3.2. MÉTODO DE DETERMINACIÓN POR PRECONCENTRACIÓN

3.2.1. Estudios Preliminares

3.2.2. Optimización Univariante

3.2.3. Optimización Multivariante mediante el MSM

3.2.4. Validación del método

3.2.5. Sistema de Membrana Líquida de Volumen

**3.3. MÉTODO DE PRECONCENTRACIÓN POR TÉCNICAS
EXTRACTIVAS MEDIANTE EL USO DE 1,2-CHBBH**

3.3.1. Ensayos Previos

3.3.2. Extracción de cobre

3.3.3. Reextracción de cobre

3.3.4. Aplicación

**3.3.5. Utilización de 1,2-CHBBH como transportador de cobre en
sistemas de membranas líquidas**

CAPÍTULO 4

En el capítulo 2 de la presente memoria se han mostrado los estudios que se llevaron a cabo para el desarrollo, optimización y validación de un nuevo método espectrofotométrico para el análisis de cobre en muestras acuosas mediante su reacción con dPKBH.

En este capítulo, los trabajos realizados, que se presentan a continuación, se llevaron a cabo con los siguientes objetivos: En primer lugar, para minimizar posibles problemas de contaminación como consecuencia de la manipulación de las muestras así como para reducir el consumo tanto de muestras como reactivos, se desarrolló un método que permitiera la determinación *on-line* y en continuo de cobre en muestras salinas mediante el análisis por inyección en flujo, FIA. En segundo lugar, y dado que los niveles de concentración en los que se encuentra el analito en este tipo de muestras son del orden de los $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, era necesario desarrollar un método que tuviera un límite de detección inferior a éstos para que fuera aplicable al mayor número de muestras reales posible. En este sentido, se utilizó un sistema de membrana líquida de volumen, el cual permite evitar los efectos no deseados producidos por matrices complejas, o bien mejorar los niveles de sensibilidad mediante la preconcentración del metal a analizar previa a su medida. Dicho sistema ha sido previamente desarrollado y aplicado satisfactoriamente, por lo que tan sólo se describirán las distintas experiencias llevadas a cabo para la puesta a punto del nuevo sistema acoplado (FIA-MLV) así como los resultados obtenidos, habiéndose enfocado los estudios hacia el análisis de muestras salinas. Por último, se describirán las distintas experiencias realizadas para poner a punto un nuevo método de determinación de cobre en muestras acuosas mediante el uso de técnicas de preconcentración. En este caso se ha estudiado la aplicación de un nuevo reactivo tipo *hidrazona*, más concretamente una bis-aroílhidrazona derivada de cetonas cíclicas, la 1,2-ciclohexanodiona-bisbenzoílhidrazona (1,2-CHBBH). Este agente será la base de funcionamiento de los sistemas de preconcentración que se proponen, que fundamentalmente consistirán en la utilización de la extracción con disolvente, pudiéndose igualmente ampliar ésta al campo de las membranas líquidas.

1. INTRODUCCIÓN

Hoy día nos encontramos con una gran cantidad de métodos analíticos que se han desarrollado para determinar la concentración de metales en todo tipo de matrices. Actualmente, muchos de los estudios están centrados en la determinación de éstos en muestras medioambientales, lo que ha dado lugar a la utilización de técnicas analíticas muy sensibles, cada vez más sofisticadas y complejas (cromatografía líquida de alta resolución, voltamperometría de redisolución, espectrometría de masas acoplada a plasma analítico, etc.). No obstante, además de las importantes ventajas, éstas presentan algunos inconvenientes operacionales, además de su excesivo coste, tanto de adquisición como de mantenimiento. En este sentido, el desarrollo de métodos basados en técnicas más asequibles como las espectroscópicas no debe descartarse (absorción atómica de llama y electrotérmica, emisión atómica, espectrofotometría UV/visible, fluorescencia). En muchos casos, estas técnicas carecen de la suficiente sensibilidad como para poder determinar la concentración del analito o analitos de interés, por lo que es habitual encontrar métodos en los que previamente se tiene que realizar una etapa de separación y preconcentración. Esta necesidad se acentúa si se trata de muestras con matrices complejas, como es el caso del agua de mar, en las que además de existir los analitos en concentraciones muy bajas, los efectos provocados por la matriz de la muestra hacen aún más difícil su determinación. Para tratar de minimizar este problema nos encontramos con una amplia gama de métodos de separación, como aquellos en los que se utilizan columnas intercambiadoras, en las cuales se separa, concentra y posteriormente eluye el analito de interés previamente a su medida. Otra alternativa a las columnas intercambiadoras es la extracción con disolvente. En este caso, se ponen en contacto alícuotas de la muestra con un disolvente orgánico apropiado para que el analito se separe y concentre en la fase orgánica (proceso que se puede repetir varias veces) donde posteriormente se analiza. En otras ocasiones, el analito presente en la fase orgánica se reextrae con una disolución acuosa apropiada en la que posteriormente se determina su concentración. En este último caso, se realizan en general dos procesos por separado: en primer lugar, el analito pasa desde la muestra hasta el reactivo orgánico y, el segundo proceso consiste en la reextracción de éste desde la fase orgánica hasta una disolución acuosa más apropiada para su análisis. En los últimos años, este proceso ha

CAPÍTULO 4

dado lugar a la aparición de métodos analíticos basados en la utilización de las membranas líquidas, en las cuales tienen lugar simultáneamente ambos procesos. Como ya se ha mencionado, éstas poseen la ventaja de minimizar la manipulación de las muestras con el consiguiente beneficio sobre la posible contaminación de las mismas.

A continuación se describirán brevemente algunos de los reactivos que más se han utilizado para la extracción de cobre. En este sentido, hay que señalar que el desarrollo de éstos se ha visto favorecido en gran medida desde dos perspectivas que pueden considerarse contrapuestas. Por una parte, el creciente interés por reducir la contaminación ambiental provocada por las descargas y depósitos de efluentes industriales conteniendo metales contaminantes. Esto ha provocado la implantación de una legislación cada vez más estricta y severa, que ha obligado a considerar los tratamientos de los efluentes como una parte crucial de la mayoría de los procesos industriales. Por otra, por el interés económico que puede reportar a una determinada industria la recuperación de determinados metales de sus efluentes mediante reciclado, como es el caso del cobre. Así, para su recuperación de lixiviados ácidos y amoniacaes se ha desarrollado un grupo de reactivos que consisten en oximas derivadas de cetonas o aldehídos como sustancias activas y que forman la denominada serie LIX. En la figura 4.1 se muestra de manera esquemática la estructura básica de este tipo de compuestos como extractantes de cobre.

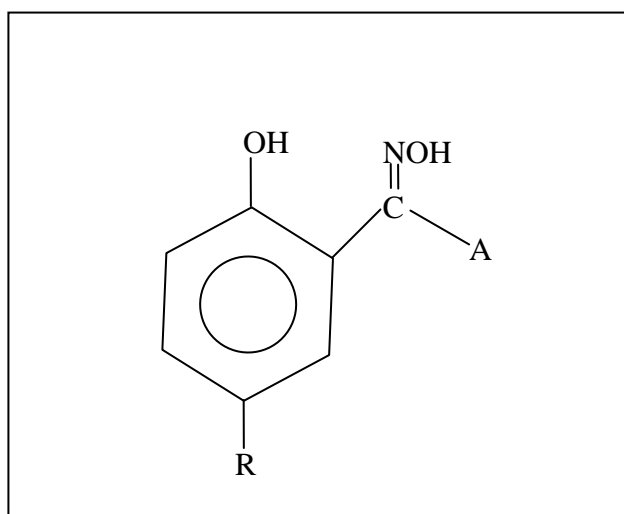


Figura 4. 1. Estructura química general de oximas.
A y R representan los diferentes sustituyentes.

De este modo, Kyuchoukov y col. emplearon LIX 84 (sustancia activa: 2-hidroxi-5-nonilacetofenona oxima), LIX 54 (sustancia activa: 1-fenildecana-1,3-diona) y la mezcla de ambos, disueltos en keroseno, para extraer cobre de disoluciones amoniacales, encontrando que la extracción de cobre seguía el orden²²²: LIX 84 > LIX 84 + LIX 54 > LIX 54. También utilizaron LIX 84 para la recuperación de cobre de lixiviados sulfurosos Sahu y col., consiguiendo su extracción prácticamente completa en dos etapas²²³. Para la separación de cobre, níquel y zinc en lixiviados amoniacales, Reddy y Priya emplearon LIX 84 I (sustancia activa: 2-hidroxi-5-t-nonilacetofenona oxima), encontrando que ésta estaba controlada por el pH en el equilibrio²²⁴. De este modo, a pH 4 se producía la extracción cuantitativa de cobre, siendo insignificante para níquel y zinc. En esta ocasión también eran necesarias dos etapas y una relación volumétrica entre las fases acuosa y orgánica de 5:1. Lazarova y Lazarova emplearon diferentes tipos de reactivos LIX para comparar, mediante un estudio cinético, la extracción de cobre de disoluciones acuosas de ácido nítrico²²⁵. De los reactivos que estudiaron, encontraron que las constantes de reacción disminuían siguiendo el orden: LIX 860N-I > LIX 984N > LIX 84-I > LIX 65N. El desarrollo de esta serie de reactivos ha estado ligado a su utilización en diversas industrias para la recuperación del metal, por lo que tras su extracción en la fase orgánica era necesaria una etapa posterior de reextracción en una disolución acuosa adecuada, habitualmente ácido sulfúrico. De ahí que se hayan propuesto la utilización de mezclas de estos reactivos para mejorar la eficacia del proceso completo: extracción-reextracción. En este sentido, Sastre y Szymanowski realizaron una revisión sobre el efecto que provocaba en las propiedades de extracción de cobre la adición de modificadores a distintas hidroxioximas²²⁶.

Además de este tipo de compuestos, se han utilizado otros cuya composición es similar a los anteriores, como el caso del 4-cloro-N-8-quinolilbencenosulfonamida

²²² Kyuchoukov, G.; Bogacki, M.; Szymanowski, J. Copper extraction from ammoniacal solutions with LIX 84 and LIX 54. *Ind. Eng. Chem. Res.*, 37, 4084, 1998.

²²³ Sahu, S.K.; Agrawal, A.; Pandey, B.D.; Kumar, V. Recovery of copper, nickel and cobalt from the leach liquor of a sulphide concentrate by solvent extraction. *Minerals Eng.*, 17, 949, 2004.

²²⁴ Reddy, B.R.; Priya, D.N. Process development for the separation of copper(II), nickel(II) and zinc(II) from sulphate solutions by solvent extraction using LIX 84I. *Sep. Pur. Tech.*, 45, 163, 2005.

²²⁵ Lazarova, Z.; Lazarova, M. Kinetics aspects of Copper-LIX extraction from nitrate/nitric acid aqueous solutions. *Solvent Extr. Ion. Exch.*, 25, 619, 2007.

²²⁶ Sastre, A.M.; Szymanowski, J. Discussion of the physicochemical effects of modifiers on the extraction properties of hydroxyoximes. A review. *Solvent Extr. Ion Exch.*, 22(5), 737, 2004.

CAPÍTULO 4

disuelto en tolueno²²⁷. Con este reactivo se consigue la extracción cuantitativa de cobre en condiciones muy ácidas. Otro tipo de compuestos que se han ensayado como posibles extractantes de cobre han sido diversos ácidos fenilcarboxílicos disueltos en octanol o benceno. Así, Yamada y col. encontraron que el ácido 2-fenilbutanóico disuelto tanto en benceno como en octanol era el mejor extractante de cobre de los que ensayaron²²⁸. En otras ocasiones se han empleado derivados organofosforados, como el caso de Cyanex 923, el cual fue utilizado por Gupta y col. para la extracción selectiva de cobre en lixiviados ácidos de nódulos de mar²²⁹, o Cyanex 302, el cual se ha empleado disuelto en queroseno por El-Hefny y Daoud para la extracción de cobre de diferentes medios acuosos²³⁰. Por último, también se ha utilizado la formación de pares iónicos para aumentar la selectividad de la extracción. En este sentido, Oshima y col. estudiaron el comportamiento de varias bases de Schiff como extractantes de cobre mediante formación de pares iónicos²³¹. Los autores encontraron que N,N'-bis(2-quinolilmetiliden)-1,3-diimino-2,2-dimetilpropano (BQMP) podía utilizarse para la extracción selectiva de cobre de otros iones divalentes.

En los estudios mencionados hasta ahora, además de las ventajas en cuanto a la selectividad de la extracción de cobre existen distintos inconvenientes, entre los que se pueden citar, entre otros: la necesidad de repetir varias veces la extracción para conseguir la recuperación completa del analito, lo cual lleva asociado un consumo elevado de reactivos y disolventes; realizar un control estricto de las condiciones de acidez del sistema para obtener buenas separaciones; pérdidas de agente extractante; solubilidad de éstos en la fase acuosa o su resistencia a la hidrólisis. Por otra parte, el desarrollo de estos compuestos se ha enfocado, desde el punto de vista industrial, a la posterior recuperación del analito de la fase orgánica, lo que ha llevado en muchas ocasiones a la pérdida de selectividad en la extracción para ganar en extractabilidad.

²²⁷ Almela, A.; Huebra, M.; Elizalde, M.P.; Menoyo, B. Copper(II) extraction by 4-chloro-N-8-quinolinybenzenesulfonamide dissolved in toluene. *J. Chem. Technol. & Biotechnol.*, 79, 299, 2004.

²²⁸ Yamada, H.; Naito, T.; Miwa, K.; Yamada, S.; Wada, H. Comparison of 1-octanol with benzene in the extraction of copper(II) with various phenylcarboxylic acids. *Anal. Sci.*, 15, 773, 1999.

²²⁹ Gupta, B.; Deep, A.; Singh, V.; Tandon, S.N. Recovery of cobalt, nickel and copper from sea nodules by their extraction with alkylphosphines. *Hydrometallurgy*, 70, 121, 2003.

²³⁰ El-Hefni, N.E.; Daoud, J.A. Extraction of copper(II) by Cyanex 302 in kerosene from different aqueous media. *Solvent Ext. Ion. Exch.*, 25, 831, 2007.

²³¹ Oshima, S.; Hirayama, N.; Kubono, K.; Kokusen, H.; Honjo T. Structural control of schiff base ligands for selective extraction of copper(II). *Anal. Sci.*, 18, 1351, 2002.

Desde el punto de vista del análisis medioambiental, también se ha utilizado la extracción con disolvente para el análisis de cobre. Algunos ejemplos se encuentran en los trabajos realizados por Watanabe y col., en los que los autores estudiaron el efecto de la adición de oxalato sódico y pirofosfato sódico como agentes enmascarantes para la separación de cobre(II) y hierro(III) mediante la extracción continua por disolvente empleando 8-hidroxiquinoleína disuelta en cloroformo²³². Encontraron que tras la adición de pirofosfato sódico, la extracción de cobre era del 99% cuando se utilizaba la extracción con disolvente en modo continuo. Teixeira y col. desarrollaron un sistema automático para llevar a cabo la separación y preconcentración de cobre mediante extracción líquido-líquido en muestras de aguas de río y lagos²³³. El método estaba basado en la formación del complejo de cobre(II) con 1-(2-piridilazo)naftol (PAN) en metilisobutil cetona (MIBK) y su posterior determinación mediante la técnica de voltamperometría de redisolución anódica. Utilizando una relación volumétrica entre las fases acuosa y orgánica 1:10 lograron un límite de detección para cobre(II) de $5 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$. Para concluir, otro grupo de reactivos empleados en la extracción por disolvente de cobre han sido los derivados del ácido fosfórico. Así, Tao y Nagaosa estudiaron la extracción de cobre por el ácido di-2-metilnonilfosfórico (DMNPA) disuelto en dodecano, tolueno y 1-octanol²³⁴. Los autores encontraron que la extracción del metal dependía del disolvente utilizado y que ésta disminuía en el orden dodecano > 1-octanol > tolueno. También obtuvieron una mayor eficacia en la extracción con DMNPA cuando lo compararon con el ácido di-2-etilhexilfosfórico (DEHPA), un reactivo frecuentemente utilizado para llevar a cabo separaciones de iones de metales de transición y de tierras raras, y que también se ha empleado para la separación y concentración de cobre mediante membranas líquidas. No obstante, al objeto de buscar nuevas alternativas, y dada la experiencia previa del grupo de investigación sobre síntesis y caracterización de reactivos orgánicos, se estudió la posibilidad de utilizar la

²³² Watanabe, K.; Tanaka, T.; Iburaim, A.; Itagaki, M. Effects of masking agents on the separation of copper(II) from iron(III) by continuous solvent extraction with 8-hydroxyquinolyne. *Anal. Sci.*, 17, 671, 2001.

²³³ Teixeira, M.C.; Fatibello, O.; Rohwedder, J.J.R. An automated system for liquid-liquid extraction based on a new micro-batch extraction chamber with on-line detection: Preconcentration and determination of copper(II). *Anal. Chim. Acta*, 525, 281, 2004.

²³⁴ Tao, W.; Nagaosa, Y. Solvent extraction of copper(II) with di-2-methylnonylphosphoric acid in some organic diluents. *Solvent Extr. Ion Exch.*, 21(2), 273, 2003.

CAPÍTULO 4

1,2-ciclohexanodiona bisbenzoílhidrazona (1,2-CHBBH) como agente preconcentrador de cobre.

A continuación se describirán las características más destacables de la 1,2-CHBBH.

Utilización de la 1,2-ciclohexanodiona bisbenzoílhidrazona

La 1,2-ciclohexanodiona bisbenzoílhidrazona (1,2-CHBBH) es un compuesto que pertenece a la familia de las hidrazonas y, más concretamente, al grupo de las bisaroihidrazonas derivadas de cetonas cíclicas. Estos compuestos ya se han descrito anteriormente como derivados imínicos que poseen en su estructura la agrupación básica $>C = N - N <$.

En general, la síntesis de estos compuestos se realiza calentando suavemente cantidades equimoleculares de la hidracida y la cetona cíclica correspondiente. El producto formado se obtiene por precipitación del mismo durante la reacción o durante el enfriamiento de la disolución. A continuación, éste se recrystaliza en un disolvente adecuado. Para la síntesis de la 1,2-CHBBH se siguió el procedimiento descrito por García-Vargas y col.²³⁵ Para ello, se pesaron las cantidades necesarias de ciclohexanodiona y benzoílhidracida para que su relación molar fuese 1:2 tras disolverlos en etanol. A continuación se mezclaron ambas disoluciones en un matraz de fondo redondo y se adicionaron unas gotas de ácido clorhídrico concentrado, dejando la mezcla a reflujo durante treinta minutos. Transcurrido este tiempo, se filtró la disolución y el precipitado se recrystalizó en etanol y posteriormente se precipitó en agua bidestilada. Por último, el producto final se secó en estufa a una temperatura de 100°C durante unos minutos. La estructura del reactivo es la que se indica en la figura 4.2.

²³⁵ García-Vargas, M.; Trevilla, S.; Milla, M. Synthesis and characterization of 1,2-cyclohexanedione bisbenzoyl-hydrazone and its application to the determination of Ti in minerals and rocks. *Talanta*, 33 (3), 209, 1986.

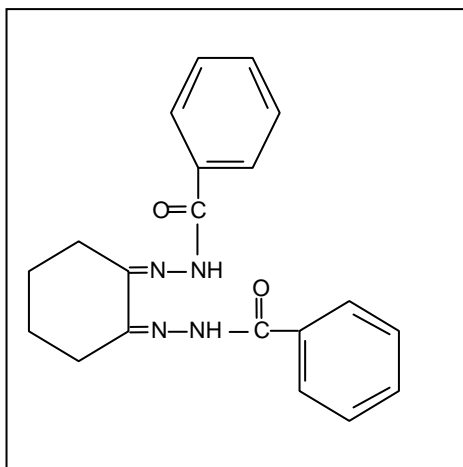


Figura 4.2. Estructura de 1,2-CHBBH.

Características físico-químicas. De acuerdo con García-Vargas y col., el espectro de infrarrojos del reactivo presenta dos bandas a 3.220 cm^{-1} y 3.170 cm^{-1} indicativas de la vibración de alargamiento del grupo N-H para aminas secundarias²³⁵; el anillo amida I presenta una banda muy fuerte a 1.655 cm^{-1} ; el anillo amida II muestra una banda media a 1.510 cm^{-1} y el anillo amida III otra banda fuerte a 1.270 cm^{-1} .

Del espectro ultravioleta del reactivo, se observa que éste sufre un efecto batocrómico cuando disminuye la polaridad del disolvente. En este sentido, una disolución del reactivo en dimetilformamida (DMF) presenta dos bandas de absorción, una a 335 nm ($\epsilon = 1,06 \cdot 10^4\text{ L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$) y otra a 277 nm ($\epsilon = 8,69 \cdot 10^3\text{ L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$). Cuando el reactivo se disuelve en etanol, las dos bandas aparecen a 328 nm ($\epsilon = 1,13 \cdot 10^4\text{ L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$) y 265 nm ($\epsilon = 1,14 \cdot 10^4\text{ L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$).

El análisis elemental del reactivo condujo a los siguientes resultados: 68,7% C; 5,8% H y 16,3% N. Los valores calculados, de acuerdo con la fórmula molecular del compuesto ($\text{C}_{20}\text{H}_{20}\text{N}_4\text{O}_2$), son 68,98% C; 5,74% H y 16,09% N, coincidiendo por tanto estrechamente con los obtenidos experimentalmente.

Además de las características espectroscópicas, se comprobó la posibilidad de obtener disoluciones del reactivo utilizando distintos disolventes. En este sentido, se

CAPÍTULO 4

comprobó que el reactivo era soluble en dimetilformamida, metanol, etanol, acetona y n-pentanol, siendo estas disoluciones estables al menos durante un mes.

Para la constante de disociación del protón del grupo $-\text{CONH}-$ del reactivo se obtuvo un valor de $10,4 \pm 0,1$.

Por último, se estudió la reactividad del compuesto con distintos iones metálicos utilizando tres disoluciones reguladoras diferentes: cloroacetato ($\text{pH} = 2,4$), acetato ($\text{pH} = 4,5$) y amoníaco ($\text{pH} = 9,5$), para cubrir un amplio intervalo de pH . Para formar los complejos correspondientes los autores adicionaban pequeños volúmenes de una disolución acuetoanólica del reactivo (al menos 40% v/v de etanol) a disoluciones acuosas que contenían el ión metálico. En estas condiciones, se obtuvieron complejos metálicos para los cationes: Fe(III) , Fe(II) , Ti(IV) , Pd(II) , V(V) , Sb(III) , W(VI) , Mo(VI) , Cu(II) y Bi(III) . No obstante, cuando se ponían en contacto las disoluciones que contenían los metales con una disolución del reactivo en cloroformo, tan sólo se extraían los complejos formados con Cu(II) , Mo(VI) , Bi(III) y Sb(III) , lo que permitía aumentar la selectividad para estos cationes. De todos ellos, es el cobre el que más aparece frecuentemente en muestras medioambientales, de ahí la posibilidad de utilizar el 1,2-CHBBH como reactivo para la extracción selectiva de cobre en muestras reales. En la figura 4.3 se muestra la estructura propuesta para el complejo formado entre 1,2-CHBBH y Cu(II) .

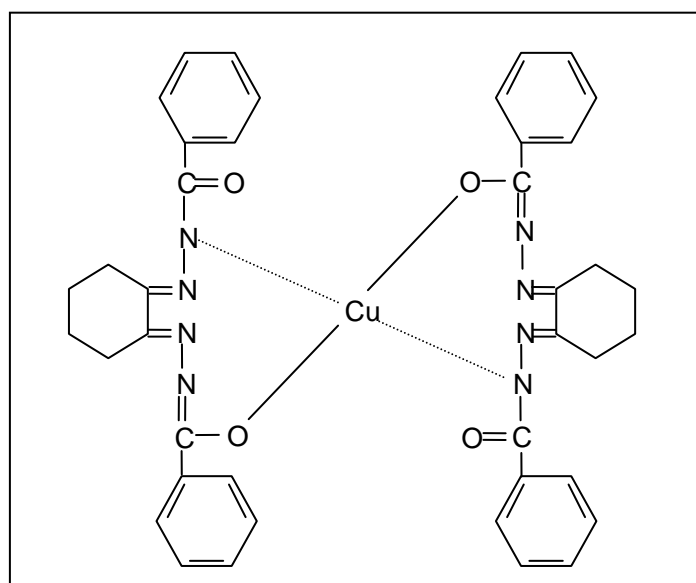


Figura 4.3. Estructura propuesta para el complejo CHBBH- Cu(II) .

2. DESARROLLO EXPERIMENTAL

A continuación se describirán las diferentes experiencias realizadas para poner a punto un método espectrofotométrico para la determinación en continuo, mediante análisis por inyección en flujo (FIA), de cobre en muestras acuosas. Seguidamente se mostrarán los estudios realizados para acoplar el sistema FIA desarrollado a un sistema de preconcentración mediante membranas líquidas de volumen. Por último, se describirán los ensayos llevados a cabo para la preconcentración de cobre mediante técnicas extractivas empleando 1,2-CHBBH como reactivo.

2.1. MÉTODO DE DETERMINACIÓN EN CONTINUO

Tras el desarrollo, optimización y validación de un nuevo método para la determinación espectrofotométrica de trazas de cobre en muestras acuosas de modo discontinuo, se procedió a la automatización del mismo utilizando la técnica de análisis por inyección en flujo (FIA).

Optimización del sistema

Como ya se indicó en el capítulo anterior, en los sistemas de análisis en flujo generalmente no se alcanza el equilibrio entre la muestra y el reactivo o reactivos con los que se une tras su inyección. Así, para obtener resultados adecuados es de gran importancia llevar a cabo una correcta optimización de las variables tanto físicas como hidrodinámicas que condicionan el funcionamiento del sistema de flujo. Estas variables generalmente son el caudal de la corriente transportadora, la longitud de los tubos reactores que se utilicen y el volumen de muestra inyectada.

En la figura 4.4 se muestra de manera esquemática el sistema FIA estudiado. Como se puede observar, éste consta de dos canales por los que circulaban la muestra y el reactivo espectrofotométrico, respectivamente. El reactivo usado era una disolución que contenía todos los reactivos necesarios para que tuviera lugar la formación del complejo de cobre con dPKBH en las condiciones optimizadas por el método en discontinuo.

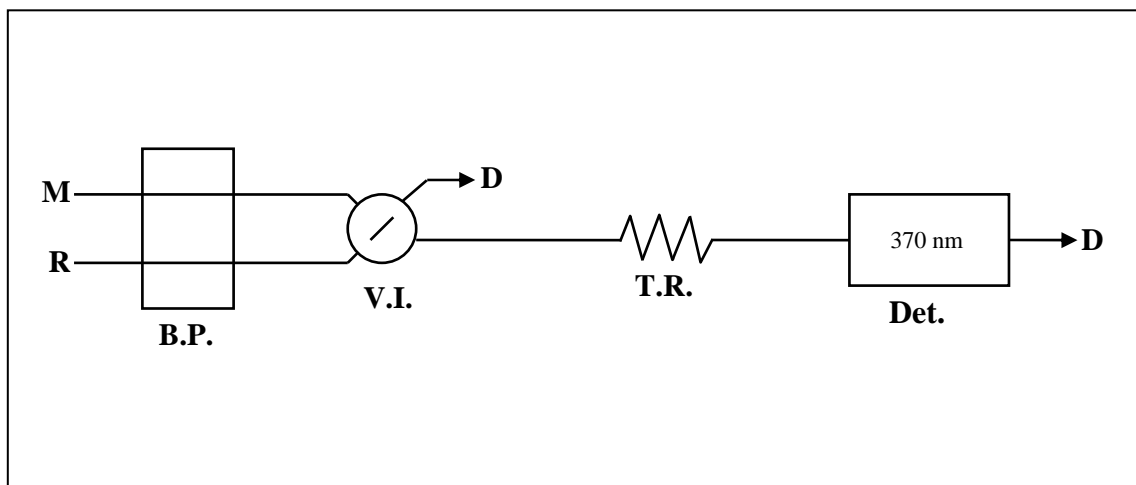


Figura 4.4. Representación esquemática del sistema FIA estudiado. B.P. Bomba Peristáltica; V.I. Válvula de Inyección; T.R. Tubo de reacción; M. Muestra; R. Reactivo ($[dPKBH] = 3,3 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$; $[\text{H}_2\text{PO}_4^-/\text{HPO}_4^{2-}] = 1,65 \cdot 10^{-2} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$; 10% etanol). Det. Detector. D. Desechos.

La optimización del sistema se abordó en dos etapas. En la primera de ellas se empleó una metodología univariante, cuyos resultados se utilizaron a modo de estudio de pre-optimización, y para su comparación con los obtenidos mediante el segundo proceso, realizado con una metodología multivariante, mediante la utilización nuevamente del método símplex modificado (Anexo I).

Como se ha mencionado anteriormente, las variables a optimizar fueron el volumen de muestra, la longitud del tubo de reacción y el caudal del reactivo transportador. En todos los casos, la muestra contenía $0,1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} \text{ Cu(II)}$, estando la disolución usada como transportador constituida por una mezcla del reactivo espectrofotométrico ($[dPKBH] = 3,3 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$); una disolución reguladora de fosfatos ($[\text{H}_2\text{PO}_4^-/\text{HPO}_4^{2-}] = 1,65 \cdot 10^{-2} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$) y un 10% de etanol para asegurar la disolución del dPKBH.

Una vez optimizadas las variables que controlaban el comportamiento del sistema propuesto, éste se aplicó a la determinación de cobre en diferentes muestras reales.

2.2. MÉTODO DE DETERMINACIÓN POR PRECONCENTRACIÓN

Después de haber desarrollado un nuevo método para la determinación de cobre en muestras acuosas y aplicarlo satisfactoriamente en continuo, el siguiente objetivo consistía en tratar de desarrollar un sistema acoplado en el que se pudiera preconcentrar el ión metálico, cuando fuera necesario, en muestras salinas. En definitiva, se trataba de acoplar el sistema FIA desarrollado a un sistema de membrana líquida que fuera capaz de preconcentrar cobre y, al mismo tiempo, evitara los problemas que presentan las muestras con matrices salinas. En este sentido, Mendiguchía y col. han desarrollado un sistema de determinación de cobre en muestras salinas mediante la preconcentración con membranas líquidas de volumen¹⁸⁴. En la figura 4.5 se muestra el sistema de membrana utilizado. Como se puede observar, éste estaba formado por dos vasos concéntricos en los que se introducían la muestra (disolución cargada) y una disolución de ácido nítrico 2,13 mol·L⁻¹ (disolución receptora). Para que tuviera lugar el proceso de preconcentración se adicionaba una disolución 144 mmol·L⁻¹ de ácido di-2-etilhexil fosfórico (dEHPA) disuelto en keroseno sobre la superficie de ambas, que actuaba como membrana líquida.

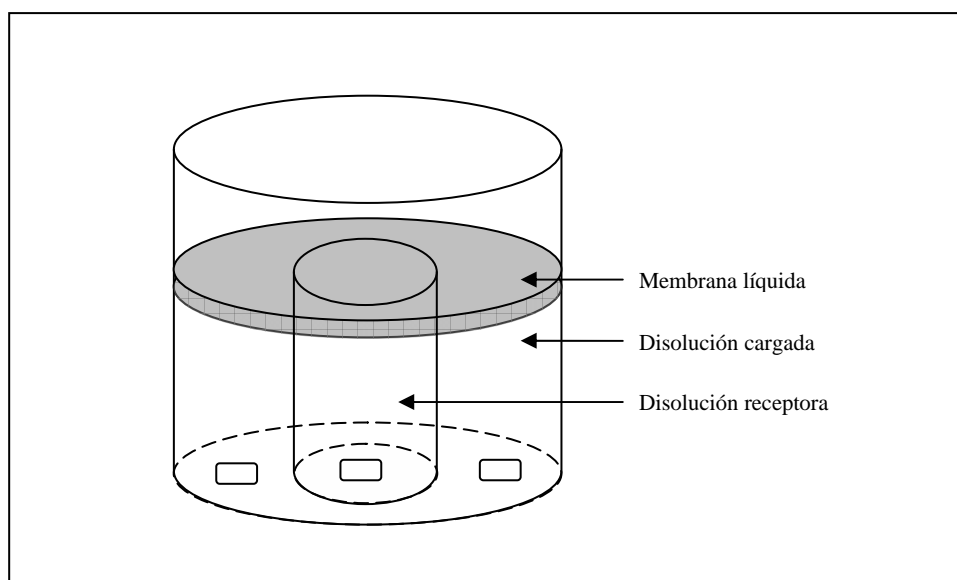


Figura 4.5. Sistema de membrana líquida utilizado.

CAPÍTULO 4

En primer lugar, se comenzó el estudio comprobando la adecuación del sistema FIA desarrollado a las condiciones en las que se obtenía la muestra tras su preconcentración en el sistema de membrana (el analito se recogía en una disolución de ácido nítrico 2,13 M). Posteriormente se realizaron las modificaciones necesarias sobre el sistema FIA para asegurar la correcta formación del complejo Cu(II)-dPKBH en las condiciones óptimas de pH (aproximadamente 8). Una vez que se alcanzaron las condiciones químicas adecuadas, se procedió a la optimización de las variables hidrodinámicas del nuevo sistema FIA utilizando los métodos univariante y simplex modificado. A continuación, con las condiciones optimizadas para el nuevo sistema FIA, se realizaron una serie de ensayos preliminares con el sistema de membrana para encontrar las características más apropiadas. Por último, tras la comprobación del buen funcionamiento del sistema acoplado éste se aplicó a la determinación de cobre en muestras salinas.

2.3. MÉTODO DE PRECONCENTRACIÓN POR TÉCNICAS EXTRACTIVAS MEDIANTE EL USO DE 1,2-CHBBH

En primer lugar, se realizaron una serie de ensayos preliminares encaminados a la comprobación del adecuado comportamiento del reactivo y, a continuación, se estudiaron las condiciones más favorables para que tuviera lugar la extracción. En este sentido, los estudios de optimización se llevaron a cabo en dos etapas: en primer lugar, se realizó una pre-optimización univariante de las variables que podían afectar al sistema de extracción, esto es, el pH de la disolución acuosa así como su salinidad, la concentración de reactivo y el tiempo de agitación. Posteriormente se concretó la optimización mediante un estudio multivariante, utilizando en este caso un diseño factorial central compuesto (Anexo II). Una vez obtenidas las condiciones óptimas para este proceso, se estudiaron las condiciones más favorables para que tuviera lugar la reextracción mediante la utilización de diferentes ácidos inorgánicos. A continuación se aplicó el método desarrollado a la determinación de la concentración de cobre en muestras acuosas con matrices diferentes.

Por último, dado que los sistemas de membrana líquida poseen la ventaja, entre otras, de la simultaneidad de los procesos de extracción y reextracción, se realizaron diversas experiencias para comprobar la aplicabilidad del reactivo extractante en dichos sistemas. Para ello, se utilizaron las condiciones químicas optimizadas previamente. Asimismo, se empleó el sistema FIA desarrollado en este capítulo para acoplar al nuevo sistema de membrana, dado que tan sólo suponía un cambio en el ácido empleado en la disolución receptora y que, además, la concentración de ambos era prácticamente similar.

2.3.1. Ensayos Preliminares

Para llevar a cabo el proceso de extracción líquido-líquido es necesario que las dos disoluciones que se pongan en contacto sean inmiscibles entre sí. De este modo, el reactivo 1,2-CHBBH debe estar disuelto en un disolvente orgánico que sea inmiscible con la disolución acuosa que contiene el analito, en este caso, el cobre. En este sentido, se ensayaron como posibles disolventes Keroseno, Xileno y Tolueno.

A continuación se realizaron una serie de experiencias encaminadas a la comprobación del adecuado comportamiento del reactivo como agente extractante de cobre. Para ello, se preparó una disolución acuosa que contenía $1 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ Cu(II) así como una disolución $2,57\cdot 10^{-3} \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ del reactivo disuelto en tolueno con un porcentaje final de DMF del 2% (v/v). El proceso seguido se describe a continuación:

En tubos de vidrio se adicionaban volúmenes adecuados de disolución acuosa conteniendo el analito (muestras) o sin él (blancos) y de la disolución de 1,2-CHBBH para que la relación volumétrica entre ambas (acuosa:orgánica) fuera 1:1; 1:2 y 2:1. A continuación se cerraban los tubos y se agitaban durante 5-15 minutos. Transcurrido dicho periodo, y una vez separadas completamente ambas fases, se tomaban alícuotas de la disolución acuosa que se medían por espectroscopía de absorción atómica de llama.

CAPÍTULO 4

2.3.2. Extracción de cobre

En todos los casos, el proceso que se llevaba a cabo era similar al descrito anteriormente, salvo que la agitación de los tubos se realizaba de manera mecánica durante una hora a 40 traslaciones por minuto (40 tpm) y la relación de volúmenes entre ambas fases era siempre 1:1. Por otro lado, hay que señalar que todas las disoluciones acuosas utilizadas se preparaban por duplicado al objeto de disponer de mayor cantidad de información.

2.3.3. Reextracción de cobre

Una vez que se optimizaron las condiciones en las que se producía la extracción del analito desde la fase acuosa hasta la orgánica, se procedió al estudio de las condiciones más favorables para que tuviera lugar el proceso de reextracción. En este sentido, hay que señalar que para que la reacción transcurra en sentido inverso es necesario aportar protones al sistema, de ahí que la fase acuosa sea una disolución ácida. Para ello, se ensayó el uso de diversos ácidos tales como ácido nítrico (HNO_3), ácido clorhídrico (HCl), ácido sulfúrico (H_2SO_4) y ácido perclórico (HClO_4), variándose las concentraciones entre $10^{-2} \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ y $2 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$.

El proceso seguido para llevar a cabo la optimización fue el siguiente:

Una vez realizada la extracción a disoluciones salinas que contenían $1 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ Cu(II) con 1,2-CHBBH en las condiciones óptimas, se tomaban alícuotas de las fases acuosas y se medían por espectroscopía de absorción atómica para confirmar la ausencia de analito en las mismas. De este modo, las correspondientes fases orgánicas se encontraban cargadas con todo el analito. Para verificar el proceso de reextracción, se tomaban alícuotas de la disolución orgánica cargada y se mezclaban con el mismo volumen de las distintas disoluciones de ácidos agitando durante una hora a 40 tpm. Concluída la agitación, se dejaban separar ambas fases y se determinaba la concentración de analito en la disolución acuosa por espectroscopía de absorción atómica de llama.

2.3.4. Aplicación

Para verificar la validez del proceso de extracción-reextracción de cobre utilizando como reactivo la 1,2-CHBBH, se analizaron diversas muestras reales de distinta composición. Dos de ellas se correspondían a muestras salinas recogidas en las bahías de Cádiz y de Huelva, respectivamente, mientras que la tercera era una muestra de agua potable. Dichas muestras habían sido previamente analizadas por espectroscopía de emisión de plasma acoplado inductivamente (ICP-AES) y por voltamperometría de redisolución anódica (ASV). Cada una de ellas se sometió al nuevo proceso de análisis por triplicado, comparándose los resultados que se obtuvieron para la concentración de cobre con los obtenidos previamente con las técnicas de referencia.

2.3.5. Utilización de 1,2-CHBBH como transportador de cobre en sistemas de membranas líquidas

Como ya se ha comentado anteriormente, si los comparamos con los procesos de extracción-reextracción descritos, los sistemas de membranas líquidas ofrecen, entre otras, las siguientes ventajas:

- 1ª. Los procesos de extracción y reextracción se llevan a cabo simultáneamente.
- 2ª. Reducen la manipulación de la muestra, disminuyendo así el riesgo de contaminación.
- 3ª. Bajo condiciones químicas e hidrodinámicas controladas se pueden alcanzar factores de preconcentración elevados.
- 4ª. Se reduce el consumo de reactivos y disolventes.
- 5ª. Pueden acoplarse fácilmente a sistemas de determinación simples y sencillos de manejar como la espectrofotometría UV/Vis.

Por tanto, dadas las adecuadas características que presentaba el reactivo 1,2-CHBBH para la determinación de cobre en muestras de diferente composición utilizando el proceso de extracción-reextracción así como las mencionadas anteriormente para los sistemas de membranas líquidas, se procedió a verificar su

CAPÍTULO 4

utilización como agente transportador de cobre en un sistema de membrana líquida de volumen.

Las distintas experiencias se realizaron utilizando un sistema de membrana como el que se mostró en la figura 4.5. Éste estaba formado por dos vasos concéntricos en los que se adicionaban la muestra (disolución cargada), en el exterior, y la disolución ácida reextractora (disolución receptora), en el interior. Para poner en contacto ambas disoluciones acuosas se utilizaba la disolución de 1,2-CHBBH en tolueno y 2% v/v de DMF, que actuaba como membrana. Para facilitar el transporte de cobre entre ambas disoluciones acuosas éstas se agitaban magnéticamente. Al objeto de seguir la evolución del proceso, se utilizó el sistema FIA desarrollado previamente. En este sentido, se utilizaron las condiciones químicas ya establecidas para la extracción-reextracción de cobre utilizando 1,2-CHBBH y las condiciones hidrodinámicas que se habían optimizado para el sistema FIA acoplado a la membrana líquida de volumen.

Por último, se aplicó el nuevo sistema desarrollado para determinar la concentración de cobre en varias muestras reales.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1. MÉTODO DE DETERMINACIÓN EN CONTINUO

A continuación se describen los resultados obtenidos para la optimización del método espectrofotométrico para el análisis de cobre mediante el análisis por inyección en flujo.

3.1.1. Optimización Univariante

Como ya se mencionó anteriormente, las variables que se estudiaron fueron el volumen de muestra, la longitud del tubo de reacción y el caudal del transportador. A continuación se describen los resultados obtenidos.

Volumen de muestra

El volumen de muestra que se inyecta en un sistema FIA está directamente relacionado con la cantidad de analito que se introduce en el sistema. Es por lo tanto un parámetro clave, pues, junto con otras variables tanto químicas como físicas, será responsable de la concentración de la especie absorbente que se forme, y por lo tanto de la magnitud de la señal registrada. El estudio se llevó a cabo variando el volumen de muestra inyectado entre 66 μL y 956 μL , manteniendo invariable el caudal de reactivo ($2,65 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$) y la longitud del tubo de reacción (1,98 m). Cada punto experimental se calculó como el valor medio de al menos tres medidas repetidas, estimándose la precisión, en forma de desviación estándar, para cada uno de ellos. En la figura 4.6 se muestran los resultados obtenidos, y en ella puede observarse, como cabía esperar, un rápido aumento de la absorbancia del complejo con el volumen de inyección. Esta tendencia se mantiene hasta un volumen de aproximadamente 700 μL , valor para el cuál las condiciones químicas e hidrodinámicas prevalecen sobre el volumen de muestra, y por lo tanto, un aumento de éste no supone un aumento en la señal.

Para experimentos posteriores se eligió un volumen de muestra de 837 μL .

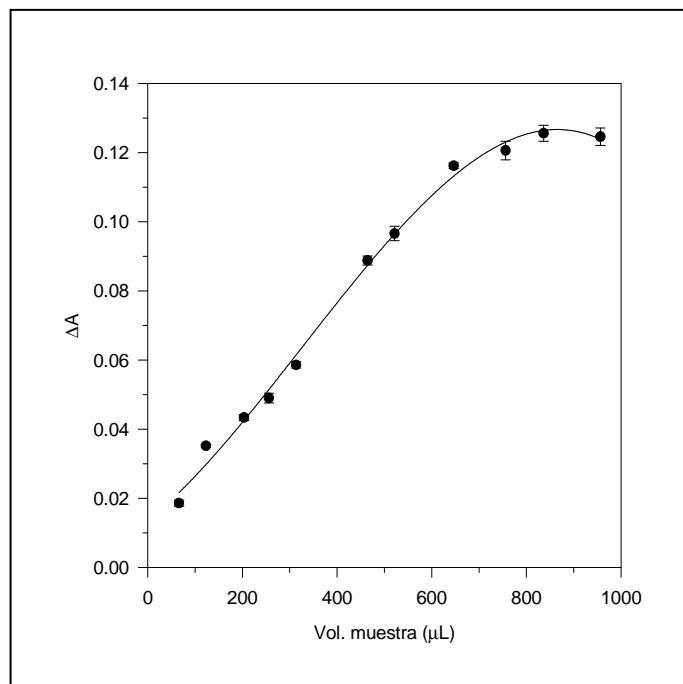


Figura 4.6. Optimización del volumen de muestra. Caudal, $2,65 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$; Longitud del tubo de reacción, $1,98 \text{ m}$. ($[\text{Cu(II)}] = 0,1 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$; $[\text{dPKBH}] = 3,3\cdot 10^{-4} \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$; $[\text{H}_2\text{PO}_4^-/\text{HPO}_4^{2-}] = 1,65\cdot 10^{-2} \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$; 10% de etanol). $\Delta A = A_{\text{complejo}} - A_{\text{blanco}}$.

Longitud del tubo de reacción

La longitud del tubo de reacción es otro parámetro de gran importancia en los sistemas FIA, ya que está directamente relacionado con el tiempo en el que la muestra entra en contacto con la disolución de reactivo para producir el complejo que posteriormente se determinará espectrofotométricamente. La optimización de éste se llevó a cabo de forma análoga al anterior, manteniendo constante el caudal de reactivo ($2,65 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$), y con el volumen de muestra previamente optimizado, esto es, $837 \mu\text{L}$. En estas condiciones, la longitud del tubo se varió entre 1 y 4 m, mostrándose los resultados en la figura 4.7. Igual que en el apartado anterior, las barras verticales indican la precisión de las medidas que se efectuaron, expresadas como la desviación estándar de tres inyecciones sucesivas.

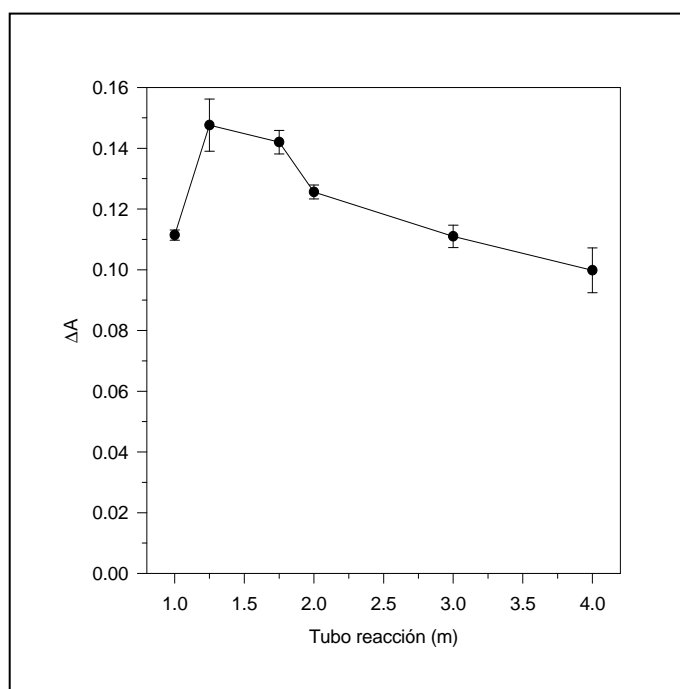


Figura 4.7. Optimización de la longitud del tubo de reacción. Caudal, 2,65 mL·min⁻¹. Volumen de muestra, 837 μ L. Resto de condiciones como en la figura 4.6.

De los resultados obtenidos se observa un aumento en la absorbancia del complejo con la longitud del tubo de reacción hasta 1,23 m, como consecuencia del predominio de la mezcla de reactivos frente a la dispersión. No obstante, éstos mostraban una elevada variación, lo cuál se traducía en una mala precisión de las medidas. Por otro lado, cuando se siguió aumentando la longitud del tubo se produjo el comportamiento inverso, como cabía esperar, debido al aumento de la dispersión, la cual aumenta con la raíz cuadrada de la distancia recorrida provocando un descenso en la altura del pico y por tanto una pérdida de sensibilidad. Así, al objeto de mantener una señal lo suficientemente alta y al mismo tiempo con buena precisión, se seleccionó como óptimo un tubo de reacción de 1,73 m de longitud.

Caudal del transportador

El caudal con el que circula la corriente transportadora a través de los tubos en un sistema FIA está directamente relacionado con su volumen, el cuál, a su vez, dependerá del diámetro interno y de la longitud de los mismos. Además, es

CAPÍTULO 4

inversamente proporcional al tiempo de residencia de la muestra e influye en la dispersión. Así, para un diseño con una longitud y diámetro de tubos constantes, un aumento en el caudal de la corriente transportadora se traduce en un descenso en el tiempo de residencia de la muestra en el sistema así como en un aumento en la dispersión. Por tanto, para obtener resultados con sensibilidad y reproducibilidad elevadas, se hace necesario controlar la velocidad con la que la corriente transportadora circula a través del sistema. Para ello se utilizan las bombas peristálticas. Entre las características más importantes que deben poseer caben destacar dos: en primer lugar que sean capaces de proporcionar un flujo libre de pulsaciones, es decir, que los distintos reactivos y muestras circulen a través de todas las conducciones del sistema de manera homogénea y, en segundo lugar, que proporcionen un caudal constante, para asegurar que en todo momento la mezcla de reactivos se realice en las mismas condiciones, y con ello la reproducibilidad en las medidas.

Para la optimización de esta variable se mantuvieron constantes, y en los valores previamente optimizados, el volumen de muestra (837 μL) y la longitud del tubo reactor (1,73 m), mientras que el caudal de la disolución de reactivo se varió entre 1,32 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$ y 6,62 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$. En la figura 4.8 se muestran los resultados obtenidos, e igual que en los casos precedentes, las barras indican la precisión de los datos para cada una de las velocidades ensayadas. Como puede observarse, la absorbancia del complejo aumenta progresivamente con un aumento del caudal hasta 5,3 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$, donde se obtiene la máxima señal. En estas condiciones, la mezcla entre la muestra y el reactivo, es decir, las características químicas del sistema, prevalecen frente a las hidrodinámicas. Si se continúa aumentando el caudal, se produce el comportamiento inverso, la señal analítica disminuye como consecuencia de una mayor dispersión de la zona de muestra.

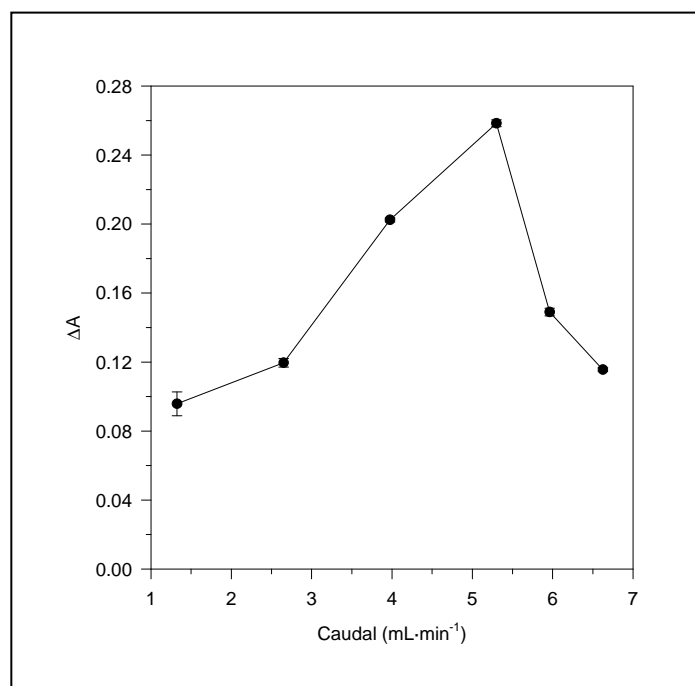


Figura 4.8. Optimización del caudal de la corriente transportadora. Volumen de muestra, 837 μL . Longitud del tubo reactor, 1,73 m. Resto de condiciones como en la figura 4.6.

En resumen, las condiciones consideradas óptimas para el sistema mediante el proceso de optimización univariante fueron las siguientes: volumen de muestra: 837 μL ; longitud del tubo de reacción: 1,73 m; caudal del transportador: 5,3 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$.

A continuación se describirán los estudios realizados mediante optimización multivariante.

3.1.2. Optimización Multivariante mediante el Método Simplex Modificado

Con este método se optimizaron de manera simultánea las tres variables hidrodinámicas que controlaban el comportamiento del sistema, esto es, el volumen de muestra, la longitud del tubo de reacción y el caudal del transportador. En primer lugar, a partir de los valores obtenidos para cada una de las variables tras la optimización univariante, se definieron las condiciones iniciales para cada una de ellas y se estableció como función respuesta la absorbancia media obtenida al realizar las medidas por cuadruplicado. A continuación se estableció como criterio para detener el simplex el de

CAPÍTULO 4

las variaciones de las medidas de las respuestas (Anexo I), ya explicado anteriormente. La varianza del método se calculó experimentalmente midiendo varias muestras con el mismo contenido de Cu(II) ($0,1 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$), utilizando las condiciones optimizadas previamente. El resultado obtenido fue: $s^2 = 4,25\cdot 10^{-6}$. Con este valor de varianza y el correspondiente a cada símplex se calculaban los distintos valores de F y se comparaban con el valor teórico ($F = 1,72$ para $p = 0,67$ y $V_1 = V_2 = 3$, tabla 1, Anexo I). El proceso de evaluación finalizó cuando para un determinado símplex la relación entre las varianzas fue menor que el valor teórico, encontrándose las condiciones óptimas en aquel experimento cuya respuesta fue la más alta de entre los 4 que componían el símplex.

Una vez establecidas las condiciones en las que se iba a llevar a cabo el proceso de optimización multivariante, se comenzaron a realizar las distintas experiencias. Así, en la tabla 4.1 se muestran los valores para cada una de las variables de los 4 experimentos que constituían el símplex inicial. Tras la realización de los mismos, y aplicando las reglas del método símplex modificado para la obtención de las coordenadas del siguiente vértice, se realizaron los experimentos que se muestran en la tabla 4.2.

Tabla 4.1. Valores del símplex inicial. V: volumen de muestra; L: longitud del tubo de reacción; Q: caudal del transportador.

Vértice	V (μL)	L (m)	Q ($\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$)
1	416	2,23	1,99
2	416	1,73	3,31
3	516	1,73	1,99
4	516	2,23	3,31

Análisis de cobre en muestras acuosas

Tabla 4.2. Resultados de la optimización símplex para las variables que controlan el sistema. I: Símplex inicial; R: Reflexión; E: Expansión; C⁺: Contracción positiva; C⁻: Contracción negativa; RE: Reevaluación.

Vértice	V (μL)	L (m)	Q (mL·min ⁻¹)	A	Tipo
1	416	2,23	2,03	0,046	I
2	416	1,73	3,39	0,132	I
3	516	1,73	2,03	0,062	I
4	516	2,23	3,39	0,119	I
5	549	1,56	3,85	0,152	R
6	616	1,23	4,74	0,193	E
7	516	1,73	5,64	0,212	R
8	516	1,73	7,46	0,096	E
9	516	0,90	5,80	-----	R
10	516	1,90	3,99	0,186	C ⁻
11	683	1,51	6,18	0,126	R
12	483	1,68	4,09	0,201	C ⁻
13	461	1,19	5,67	0,198	R
14	424	1,84	5,53	0,188	R
15	568	1,38	4,94	0,192	C ⁻
16	484	2,00	4,12	0,191	R
17	542	1,39	5,29	0,213	C ⁻
18	459	1,82	5,07	0,203	R
19	516	1,73	5,64	0,190	RE7
20	528	1,61	6,56	0,126	R
21	494	1,66	4,72	0,200	C ⁻
22	481	1,52	4,42	0,194	R
23	490	1,57	4,72	0,204	C ⁺
24	500	1,53	5,34	0,208	R
25	562	1,17	5,15	0,210	R

CAPÍTULO 4

Tabla 4.2. Continuación.

Vértice	V (μL)	L (m)	Q (mL·min⁻¹)	A	Tipo
26	579	1,16	5,80	0,142	R
27	542	1,39	5,29	0,203	RE17
28	512	1,47	4,99	0,250	C ⁻
29	577	1,16	4,94	0,198	R
30	519	1,44	5,23	0,227	C ⁻
31	520	1,33	4,96	0,249	R
32	472	1,66	4,96	0,205	R
33	540	1,29	5,10	0,252	C ⁻
34	529	1,29	4,80	0,255	R
35	534	1,21	4,58	0,205	E
36	534	1,37	4,96	0,245	R
37	557	1,16	4,91	0,220	R
38	523	1,39	4,96	0,241	C ⁻

En la tabla 4.3 se muestran los valores obtenidos para cada símplex en el proceso de optimización. Como se puede observar, en el símplex 19 el valor F calculado (1,65) fue menor que el teórico (1,72), lo cual indica que las variaciones de las respuestas surgen como consecuencia de errores aleatorios y, por tanto, se ha alcanzado el máximo. Dado que el valor más alto de absorbancia (función respuesta) se obtuvo para el experimento 34, las condiciones óptimas seleccionadas fueron las correspondientes al mismo:

Volumen de muestra: 529 μL
Longitud del tubo de reacción: 1,29 m
Caudal del transportador: 4,80 mL·min⁻¹.

Análisis de cobre en muestras acuosas

Tabla 4.3. Progreso del símplex. A: absorbancia media del símplex; S_s^2 : Varianza del símplex.

Nº símplex	Experimentos	A	S_s^2	F (S_s^2 / s^2)
1	1, 2, 3 y 4	0,088	$1,68 \cdot 10^{-3}$	395,29
2	2, 3, 4 y 6	0,126	$2,89 \cdot 10^{-3}$	680,00
3	2, 4, 6 y 7	0,164	$2,06 \cdot 10^{-3}$	484,70
4	2, 6, 7 y 10	0,181	$1,18 \cdot 10^{-3}$	277,65
5	6, 7, 10 y 12	0,198	$1,25 \cdot 10^{-4}$	29,41
6	6, 7, 12 y 13	0,201	$6,47 \cdot 10^{-5}$	15,22
7	7, 12, 13 y 15	0,201	$7,02 \cdot 10^{-5}$	16,52
8	7, 12, 15 y 17	0,204	$9,90 \cdot 10^{-5}$	23,29
9	12, 17, 18 y 19	0,202	$8,89 \cdot 10^{-5}$	20,92
10	17, 18, 19 y 21	0,202	$8,97 \cdot 10^{-5}$	21,11
11	17, 18, 21 y 23	0,205	$3,13 \cdot 10^{-5}$	7,36
12	17, 18, 23 y 24	0,207	$2,07 \cdot 10^{-5}$	4,87
13	17, 23, 24 y 25	0,209	$1,42 \cdot 10^{-5}$	3,34
14	23, 24, 25 y 27	0,206	$1,09 \cdot 10^{-5}$	2,56
15	24, 25, 27 y 28	0,218	$4,71 \cdot 10^{-4}$	110,80
16	25, 27, 28 y 30	0,222	$4,38 \cdot 10^{-4}$	102,98
17	25, 28, 30 y 31	0,234	$3,69 \cdot 10^{-4}$	86,74
18	28, 30, 31 y 33	0,244	$1,38 \cdot 10^{-4}$	32,39
19	28, 31, 33 y 34	0,252	$7,00 \cdot 10^{-6}$	1,65
20	28, 33, 34 y 36	0,250	$1,77 \cdot 10^{-5}$	4,16
21	33, 34, 36 y 38	0,248	$4,09 \cdot 10^{-5}$	9,63

Las condiciones óptimas que se alcanzaron mediante la optimización símplex dieron lugar a valores de absorbancia para la muestra semejantes a los que se obtenían mediante la optimización univariante indicando la ausencia de grandes correlaciones. Sin embargo, aquéllas presentaban las siguientes ventajas:

- 1ª. El volumen de inyección de muestra necesario era bastante menor (529 μL frente a 837 μL), lo cual posibilitaba un mayor número de inyecciones para el

CAPÍTULO 4

mismo volumen de muestra. Por tanto, se reducía notablemente el volumen de muestra necesario para llevar a cabo el análisis.

2ª. El caudal del transportador también era menor ($4,8 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ frente a $5,3 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$), lo cual se traducía en un menor consumo de reactivos y, por tanto, en un menor coste por análisis.

3ª. La longitud del tubo de reacción también era menor ($1,29 \text{ m}$ frente a $1,73 \text{ m}$). Esto se relaciona con el tiempo necesario para que el complejo formado pase a través del detector para ser medido, lo cual implica que éste se reduce para cada análisis. Por tanto, el número de análisis que se podían efectuar aumentaba.

Como cabía esperar, la utilización del método símplex modificado permitió una selección más adecuada de las condiciones experimentales que controlaban el comportamiento del sistema. Además, también se producía una mejora en las señales analíticas obtenidas. Por tanto, para las siguientes experiencias que se llevaron a cabo se emplearon las condiciones anteriormente descritas:

Volumen de muestra: $529 \mu\text{L}$.

Longitud del tubo de reacción: $1,29 \text{ m}$.

Caudal del transportador: $4,80 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$

3.1.3. Validación del método

Una vez que se obtuvieron las condiciones óptimas de medida para el método de análisis por inyección en flujo desarrollado, se procedió a su validación. En esta ocasión, este proceso se basó en el estudio de los siguientes parámetros: intervalo de linealidad, límites de detección y cuantificación, precisión y exactitud. A continuación se mostrarán los resultados obtenidos.

Intervalo de linealidad

Para determinar el intervalo de concentración de cobre para el cual la relación entre ésta y la absorbancia era lineal, se prepararon diversas muestras con distinta concentración de Cu(II) y se midieron sus absorbancias a 370 nm frente a su blanco correspondiente en las condiciones optimizadas por el método símplex. De los resultados obtenidos, que se muestran en la figura 4.9, se puede observar que éstos mantenían un comportamiento lineal hasta $3 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ Cu(II), marcando esta concentración, por tanto, el final del intervalo de aplicabilidad.

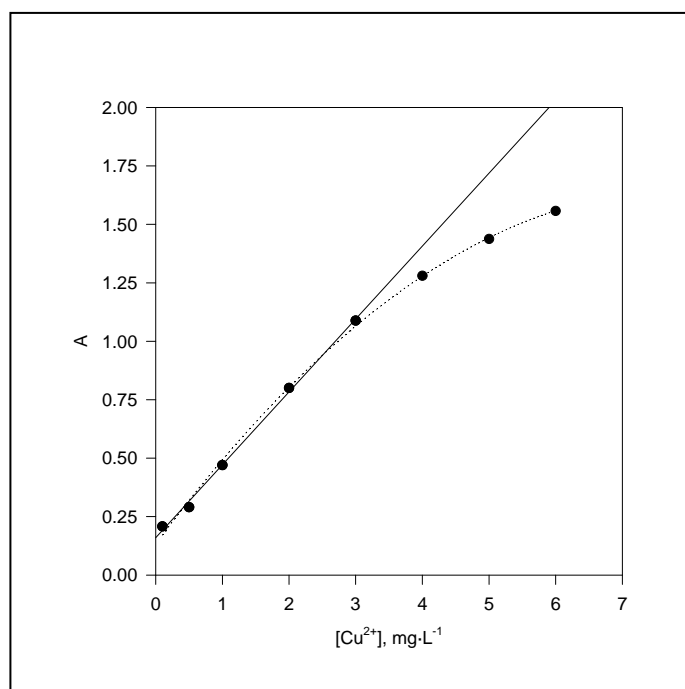


Figura 4. 9. Intervalo de linealidad para Cu(II) por FIA.
[dPKBH] = $3,25\cdot 10^{-4} \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$; $[\text{H}_2\text{PO}_4^-/\text{HPO}_4^{2-}] = 1,65\cdot 10^{-2} \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$; 10 % etanol.

En este intervalo, la ecuación de ajuste para la recta de calibrado que rige el comportamiento del sistema fue:

$A = 0,312 (\pm 0,028) [\text{Cu(II)}] + 0,160 (\pm 0,015)$	$r^2 = 0,9976$
---	----------------

CAPÍTULO 4

En dicha ecuación, los intervalos de confianza para la pendiente y la ordenada en el origen se calcularon como ts_b y ts_a , siendo s_b y s_a las desviaciones estándar relativas para la pendiente y la ordenada en el origen, respectivamente, y t es el parámetro de la distribución de Student para $n-2$ grados de libertad al 95% de confianza ($p = 0,05$).

Límites de detección y cuantificación

Para su estudio, se obtuvieron diferentes rectas de calibrado en las que se variaba el intervalo de concentración de cobre en las muestras. De este modo, en la tabla 4.4 se muestran los parámetros de ajuste de las rectas de regresión para los diferentes intervalos estudiados. Cada recta se construyó con cinco puntos como mínimo, realizándose al menos tres medidas de cada uno de ellos. En la última columna de dicha tabla se muestran los límites de detección para cada intervalo, utilizándose el criterio del cociente entre tres veces la desviación estándar de la ordenada en el origen y la pendiente de la recta, para obtenerlos. Como se puede observar, para el intervalo de concentraciones más bajo estudiado se encuentra que el límite de detección del sistema FIA desarrollado es:

$$\text{L.D.} = 4,59 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$$

Este valor resulta del mismo orden de magnitud, aunque lógicamente ligeramente superior, que el obtenido tras la puesta a punto de la metodología en discontinuo, por lo que se puede concluir que el método de análisis aquí desarrollado no sólo es simple, rápido y sencillo sino que además presenta una muy buena sensibilidad.

Tabla 4.4. Intervalos de concentración empleados para el cálculo del límite de detección.

Intervalo ($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$)	Ordenada en el origen	Pendiente	r^2	$^a s_a$	$^a s_b$	L.D. ($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$)
0 – 3	$-3,0\cdot 10^{-3}$	0,316	0,995	0,0214	0,0127	0,203
0 - 0,5	$4,8\cdot 10^{-3}$	0,260	0,991	0,0032	0,0142	0,037
0 - 0,1	$-2,0\cdot 10^{-4}$	$3,9\cdot 10^{-4}$	0,998	0,0006	$9,5\cdot 10^{-6}$	$4,59\cdot 10^{-3}$

^a s_a y s_b son las desviaciones estándar de la ordenada en el origen y la pendiente, respectivamente

Análisis de cobre en muestras acuosas

Análogamente, para el límite de cuantificación (L.C.) se obtiene:

$$\text{L.C.} = 15,3 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$$

Precisión

Para establecerla se prepararon once disoluciones que contenían la misma concentración de cobre ($0,1 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$) y se midieron en las condiciones optimizadas. Los resultados que se alcanzaron se muestran en la figura 4.10 y, como puede observarse, indican una adecuada *repetibilidad* en las medidas.

$$\text{R.S.D.} = 2,11\%$$

Para evaluar la *reproducibilidad* se utilizaron los resultados obtenidos tras el análisis de disoluciones que contenían la misma concentración de analito, pero realizados en días diferentes.

$$\text{R.S.D.} = 2,91\%$$

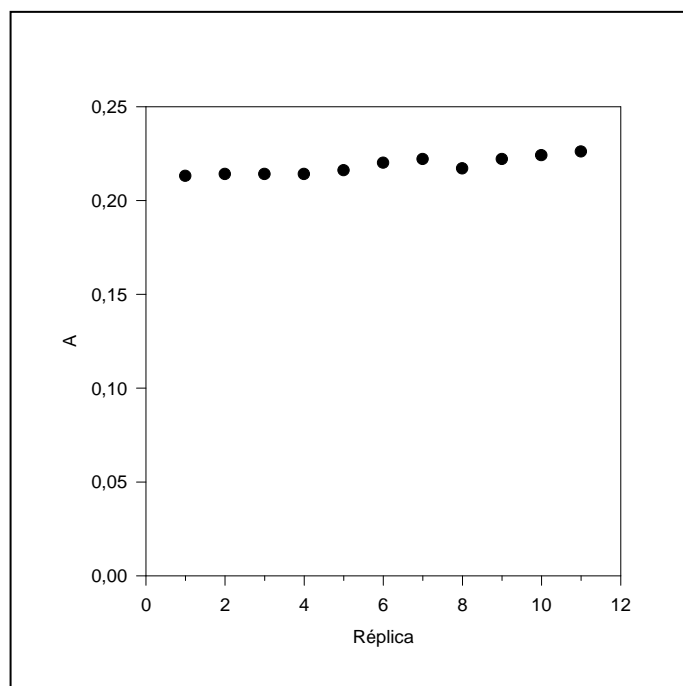


Figura 4. 10. Precisión del método. $[\text{Cu(II)}] = 0,1 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$
 $[\text{dPKBH}] = 3,25\cdot 10^{-4} \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$; $[\text{H}_2\text{PO}_4^-/\text{HPO}_4^{2-}] = 1,65\cdot 10^{-2} \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$; 10 % etanol.

CAPÍTULO 4

De los resultados obtenidos tanto para la repetibilidad como para la reproducibilidad podemos concluir que el método FIA desarrollado proporciona una buena precisión en las medidas.

Exactitud

Para evaluarla, se utilizaron las mismas disoluciones de las muestras de referencia, C31X WSB 10 y C36X CBC 40, que se emplearon para el método de determinación de Cu(II) en discontinuo y se analizaron en las condiciones optimizadas. Así, en la tabla 4.5 se muestran los resultados obtenidos al medir ambas muestras de referencia por cuadruplicado. En ésta se presenta la exactitud, expresada como error relativo y como porcentaje de recuperación. Como se puede observar, los porcentajes de recuperación indican que el método FIA desarrollado proporciona valores aceptables para ambas muestras, verificándose así su exactitud.

Tabla 4.5. Resultados obtenidos en el análisis de las muestras de referencia.

Muestra	[Cu(II)]_{certificada} (mg·L⁻¹)	[Cu(II)]_{encontrada} (mg·L⁻¹)	ε_r (%)	%R
C31X WSB 10	0,919	0,897 (± 0,005)	-2,39	97,6
C36X CBC 40	1,097	1,051 (± 0,002)	-4,19	95,8

Por tanto, a partir de los resultados obtenidos en este estudio de validación, podemos concluir que el método FIA propuesto para el análisis de cobre en aguas naturales presenta un amplio intervalo de linealidad, proporcionando valores exactos y precisos. Además, el límite de detección obtenido indica una excelente sensibilidad, similar a la obtenida en la metodología en discontinuo.

3.1.4. Aplicación

Como aplicación del nuevo método se llevó a cabo el análisis de varias muestras reales con diferentes matrices para determinar su contenido en Cu(II). En este sentido, se analizó una muestra de agua de río cuyos contenidos determinados por espectroscopía de emisión de plasma acoplado inductivamente eran: 542 µg·L⁻¹ Cu; 590

Análisis de cobre en muestras acuosas

$\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ Zn; $604 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ Fe y $63,8 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ Pb; y una muestra de agua potable cuyos contenidos, medidos por espectroscopía de absorción atómica de llama, eran: $13,21 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ Cu; $30,90 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ Zn; $41,07 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ Fe; $146,66 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ Al y $2,56 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ Mn.

Para el análisis de la primera muestra se efectuó previamente una dilución 1:10 de la misma, mientras que la segunda se midió directamente. En cada caso, los resultados obtenidos correspondían a la media de los análisis por triplicado efectuados a tres réplicas de cada una. En la tabla 4.6 se muestran los valores obtenidos al medir ambas muestras por las técnicas espectroscópicas empleadas y mediante el método propuesto. Los valores entre paréntesis expresan la incertidumbre asociada a cada una de las medidas en forma de desviación estándar. Además, se obtuvieron errores relativos similares para ambas cuando se comparó la concentración obtenida por el método con la encontrada mediante ICP (agua de río) y FAAS (agua potable). Por último, los valores encontrados del estadístico t para la comparación de medias experimentales son inferiores a los tabulados ($t = 2,78$ para $n = 4$ y $\alpha = 0,05$), indicando así la ausencia de diferencias estadísticamente significativas entre las medias.

Tabla 4.6. Resultados obtenidos en el análisis de muestras reales.

Muestra	[Cu(II)] _{referencia} , $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$	[Cu(II)] _{encontrada} , $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$	ϵ_r (%)	t
Agua de río	54,2 ($\pm 4,2$)	52,50 ($\pm 0,72$)	- 3,14	0,69
Agua potable	13,21 ($\pm 0,44$)	12,82 ($\pm 0,20$)	-2,95	1,40

3.2. MÉTODO DE DETERMINACIÓN POR PRECONCENTRACIÓN

A continuación se describen los resultados obtenidos para la puesta a punto de un método de preconcentración de cobre en muestras salinas mediante un sistema de membrana líquida de volumen y su posterior medida espectrofotométrica utilizando el método de análisis por inyección en flujo previamente optimizado.

3.2.1. Estudios Preliminares

Como se ha mencionado anteriormente, la disolución receptora utilizada en el sistema de preconcentración de cobre consistía en una disolución de ácido nítrico

CAPÍTULO 4

(HNO_3) $2,13 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$. Por tanto, los primeros ensayos que se realizaron consistieron en la comprobación de la bondad del sistema FIA previamente desarrollado. Para ello, se prepararon disoluciones que contenían 0, 50 y $100 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ de cobre en ácido nítrico $2,13 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ y se midieron espectrofotométricamente a 370 nm en las condiciones optimizadas. Los resultados obtenidos mostraron ligeros aumentos de la absorbancia con la concentración de cobre en las disoluciones. No obstante, la acidez elevada de éstas hacía que las medidas no se realizaran al valor adecuado de pH para el sistema, lo cual se comprobó recogiendo la mezcla entre el reactivo y las disoluciones de cobre a la salida del tubo de reacción y midiendo el pH. De acuerdo con esto, el siguiente paso consistió en variar la concentración de la disolución reguladora y comprobar si tenía la suficiente capacidad amortiguadora como para llevar las disoluciones hasta el valor adecuado. De nuevo se utilizaron las disoluciones de cobre mencionadas anteriormente y se efectuaron las medidas correspondientes. Los resultados obtenidos fueron similares a los anteriores, de nuevo como consecuencia de la elevada acidez que aún presentaban las disoluciones, el pH se encontraba en torno a 1. A continuación se modificó el sistema introduciendo un canal adicional por el que circulaba la disolución reguladora preparada a su concentración máxima, $0,51 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$, como se muestra en la figura 4.11. Éste se unía con el canal de muestra antes de alcanzar la válvula de inyección. De esta forma, la disolución que se mezclaba con el reactivo una vez realizada la inyección ya estaba previamente tamponada. En esta ocasión, el pH que se obtenía para las disoluciones recogidas a la salida del tubo de reacción estaba próximo a 2.

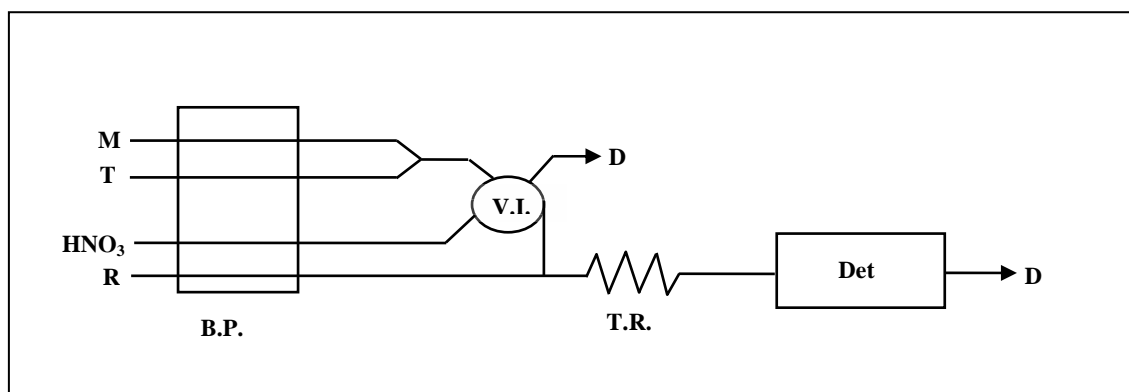


Figura 4.11. Representación esquemática del sistema FIA. M: Muestra; T: Disolución reguladora $0,51 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$; R: Reactivo ($[\text{dPKBH}] = 3,3\cdot 10^{-4} \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$; $[\text{H}_2\text{PO}_4^-/\text{HPO}_4^{2-}] = 1,65\cdot 10^{-2} \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$; 10% etanol). B.P. Bomba Peristáltica; V.I. Válvula de inyección; T.R. Tubo de reacción; Det. Detector (370 nm) y D: Desechos.

Análisis de cobre en muestras acuosas

Del comportamiento mostrado por el sistema hasta el momento, resultaba evidente que la disolución reguladora utilizada no era adecuada para mantener el pH en las condiciones óptimas de medida. Además, se modificaba completamente el sistema previamente optimizado ya que se introducían dos nuevos canales.

En este sentido, se procedió a seleccionar una nueva disolución reguladora que fuera capaz de mantener el pH en el valor adecuado. Para ello, se utilizó una disolución de $\text{NH}_4\text{Cl}/\text{NH}_3$ $1,70 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$. En primer lugar se midió el pH de la mezcla resultante de las disoluciones de ácido nítrico y de tampón a la salida del tubo de mezcla, obteniéndose valores de 8,4. Esto indicaba que la disolución reguladora tenía la suficiente capacidad amortiguadora para llevar la mezcla hasta el valor de pH necesario. A continuación, se midió el pH de la disolución que se obtenía cuando la mezcla se unía con el canal de reactivo. Para ello, se recogió un volumen adecuado de ésta a la salida del tubo de mezcla y se midió el pH, comprobándose nuevamente que el valor obtenido era el adecuado para el sistema, en esta ocasión 8,3. Posteriormente, y al objeto de simplificar el sistema de medida, se eliminó la disolución reguladora de fosfatos de la disolución del reactivo FIA y se sustituyó por la nueva disolución reguladora, esto es, la disolución de $\text{NH}_4\text{Cl}/\text{NH}_3$. De esta forma se conseguía eliminar uno de los dos canales adicionales que previamente se habían introducido. De este modo, el sistema de preconcentración con membrana acoplado al FIA quedaba como se muestra en la figura 4.12. Como se puede observar, aparece un canal adicional con respecto al sistema FIA previamente desarrollado. Esto era consecuencia de la necesidad de disponer de un canal por el que circulase la disolución de HNO_3 $2,13 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ con una doble función: por una parte, esta disolución actuaba como transportador de la muestra antes de entrar en contacto con la disolución de reactivo y, por otra, se utilizaba para regenerar la disolución receptora de la membrana una vez que se retiraba parte de ésta con el ión metálico.

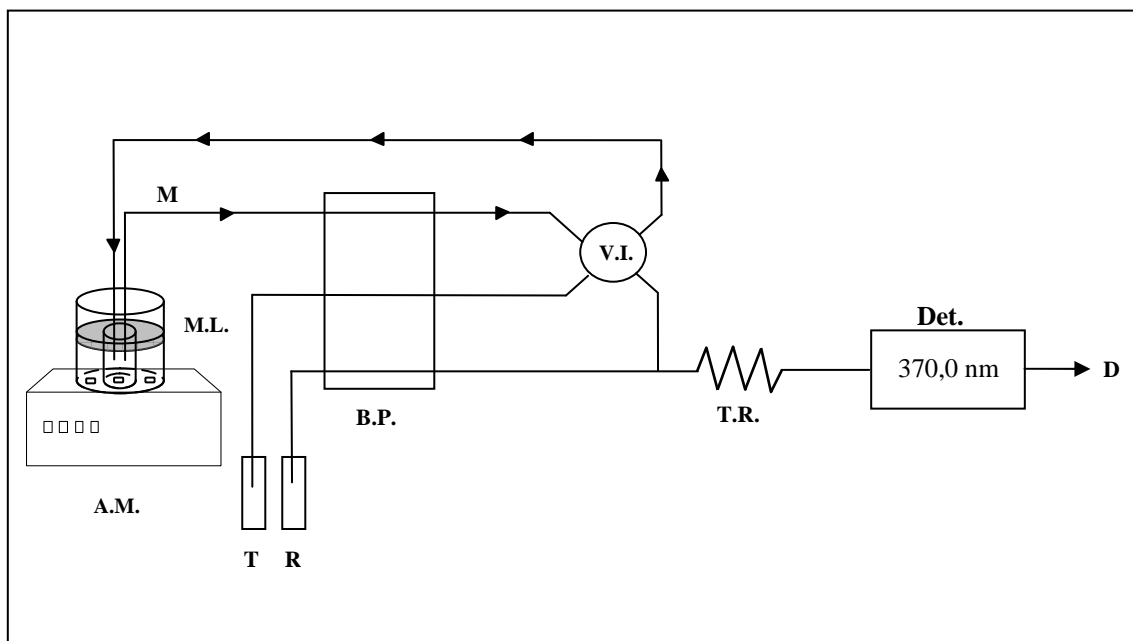


Figura 4.12. Representación esquemática del sistema desarrollado. A.M.: Agitador magnético; M.L.: Vaso de membrana líquida; M: Muestra; T: Transportador (HNO_3 $2,13 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$); R: Reactivo ($[\text{dPKBH}] = 3,3\cdot 10^{-4} \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$; $[\text{NH}_4\text{Cl}/\text{NH}_3] = 0,85 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$; 10% etanol); B.P.: Bomba peristáltica; V.I.: Válvula de inyección y D: Desechos.

Por tanto, los resultados obtenidos en los ensayos preliminares sugirieron la necesidad de realizar algunas modificaciones sobre el sistema FIA previamente desarrollado. En primer lugar, la disolución del reactivo FIA mantenía la concentración de dPKBH pero se utilizaba una disolución reguladora $\text{NH}_4\text{Cl}/\text{NH}_3$ $0,85 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ para controlar el pH del sistema. Y, en segundo lugar, se hacía necesaria la introducción de un canal adicional por el que circulara la disolución de HNO_3 $2,13 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$.

A continuación se describirán los estudios realizados para la optimización del nuevo sistema.

3.2.2. Optimización Univariante

Como ya se mencionó anteriormente, las variables a optimizar fueron el volumen de muestra, la longitud del tubo de reacción y el caudal del reactivo transportador. En todos los casos, por cada uno de los canales que formaban el sistema circulaban las siguientes disoluciones: el canal de muestra contenía $1,0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1} \text{ Cu(II)}$ en una disolución de HNO_3 $2,13 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$; el canal del transportador estaba formado por una disolución de HNO_3 $2,13 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ y el canal de reactivo consistía en una disolución que

estaba formada por una mezcla del reactivo espectrofotométrico ($[dPKBH] = 3,3 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$); una disolución reguladora de $\text{NH}_4\text{Cl}/\text{NH}_3$ $0,85 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ y un 10% de etanol para asegurar la disolución del dPKBH.

A continuación se describen los resultados obtenidos en los estudios realizados.

Volumen de muestra

El estudio se llevó a cabo variando el volumen de muestra inyectado entre 66 μL y 946 μL , manteniendo invariable el caudal de reactivo ($3,2 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$) y la longitud del tubo de reacción (1,98 m). Cada punto experimental se calculó como el valor medio de al menos tres medidas repetidas, estimándose la precisión, en forma de desviación estándar, para cada uno de ellos. En la figura 4.13 se muestran los resultados obtenidos, y en ella puede observarse, como cabía esperar, un rápido aumento de la absorbancia del complejo con el volumen de inyección. Esta tendencia se mantiene hasta un volumen de aproximadamente 600 μL , valor para el cual las condiciones químicas e hidrodinámicas prevalecen sobre el volumen de muestra, y por lo tanto, un aumento de éste no supone un aumento en la señal.

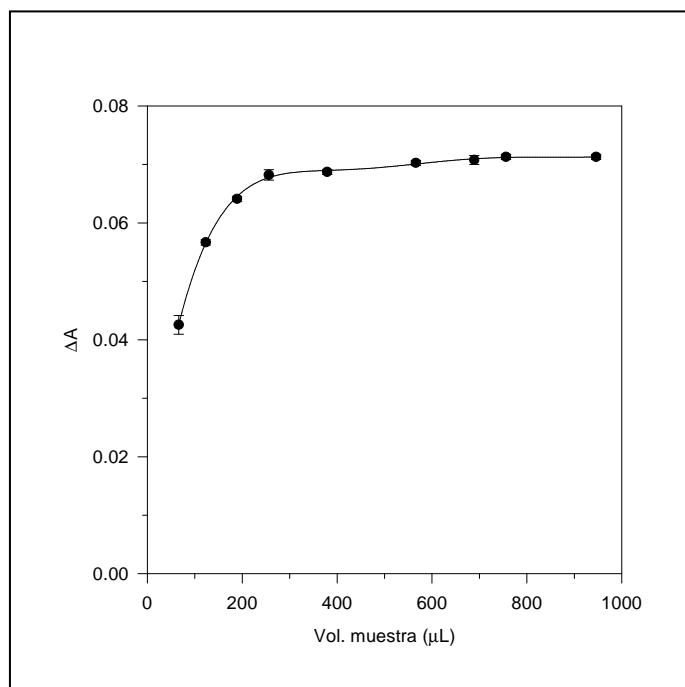


Figura 4.13. Optimización del volumen de muestra. Caudal, $3,2 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$; Longitud del tubo de reacción, 1,98 m. ($[\text{Cu(II)}] = 1,0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$; $[dPKBH] = 3,3 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$; $[\text{NH}_4\text{Cl}/\text{NH}_3] = 0,85 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$; 10% de etanol). $\Delta A = A_{\text{complejo}} - A_{\text{blanco}}$.

CAPÍTULO 4

Para experimentos posteriores se eligió un volumen de muestra de 566 μL .

Longitud del tubo de reacción

La optimización de éste se llevó a cabo de forma análoga al anterior, manteniendo constante el caudal de reactivo ($3,2 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$), y con el volumen de muestra previamente optimizado, esto es, 566 μL . En estas condiciones, la longitud del tubo se varió entre 0,98 y 3,48 m, mostrándose los resultados en la figura 4.14. Igual que en el apartado anterior, las barras verticales indican la precisión de las medidas que se efectuaron, expresadas como la desviación estándar de tres inyecciones sucesivas.

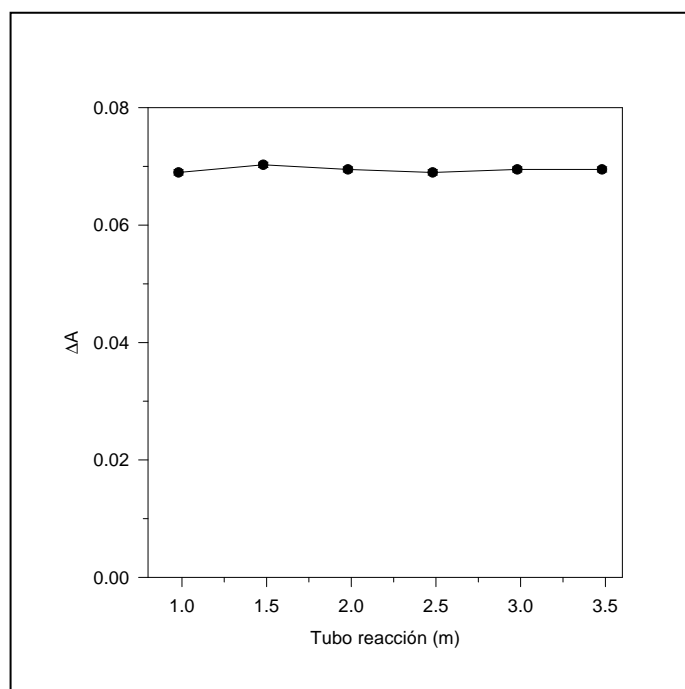


Figura 4.14. Optimización del tubo de reacción. Caudal, $3,2 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$; Volumen de muestra 566 μL . Resto de condiciones como en la Figura 4.13.

De los resultados obtenidos se observa que la absorbancia del complejo es prácticamente constante para las distintas longitudes del tubo de reacción ensayadas. Además, la precisión de las medidas realizadas es similar en todos los casos, por lo que se seleccionó como óptima la longitud del tubo de reacción más pequeño utilizado, es decir, 0,98 m.

Caudal del transportador

Para la optimización de esta variable se mantuvieron constantes, y en los valores previamente optimizados, el volumen de muestra (566 μL) y la longitud del tubo reactor (0,98 m), mientras que el caudal de la disolución de reactivo se varió entre 2,4 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$ y 5,2 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$. En la figura 4.15 se muestran los resultados obtenidos, e igual que en los casos precedentes, las barras indican la precisión de los datos para cada una de las velocidades ensayadas.

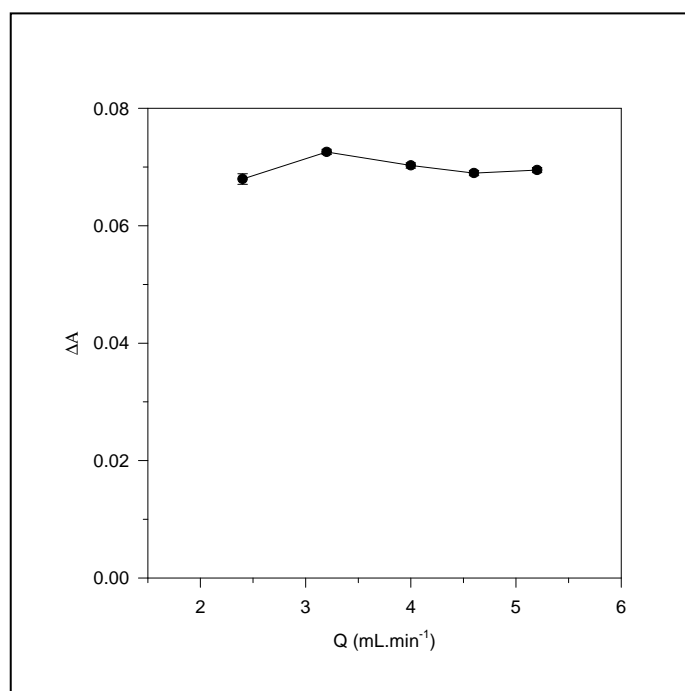


Figura 4.15. Optimización del caudal. Volumen de muestra: 566 μL ; longitud del tubo de reacción: 0,98 m. Resto de condiciones como en la Figura 4.13.

Como puede observarse, la absorbancia del complejo aumenta ligeramente con un aumento del caudal hasta 3,2 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$, donde se obtiene la máxima señal. En estas condiciones, la mezcla entre la muestra y el reactivo, es decir, las características químicas del sistema, prevalecen frente a las hidrodinámicas. Si se continúa aumentando el caudal, se produce el comportamiento inverso, la señal analítica disminuye como consecuencia de una mayor dispersión de la zona de muestra.

CAPÍTULO 4

En resumen, las condiciones consideradas óptimas para el sistema mediante el proceso de optimización univariante fueron las siguientes: volumen de muestra: 566 μL ; longitud del tubo de reacción: 0,98 m; caudal del transportador: 3,2 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$.

A continuación se describirán los resultados obtenidos mediante optimización multivariante.

3.2.3. Optimización Multivariante mediante el Método Simplex Modificado

Con este método se optimizaron de manera simultánea las tres variables hidrodinámicas que controlaban el comportamiento del sistema, esto es, el volumen de muestra, la longitud del tubo de reacción y el caudal del transportador. En primer lugar, a partir de los valores obtenidos para cada una de las variables tras la optimización univariante, se definieron las condiciones iniciales para cada una de ellas y se estableció como función respuesta la absorbancia media obtenida al realizar las medidas por cuadruplicado. A continuación se estableció como criterio para detener el simplex el de las variaciones de las medidas de las respuestas (Anexo I), ya utilizado anteriormente. Antes de iniciar el proceso de optimización se calculó experimentalmente la varianza del método. Para ello, se midieron varias muestras con el mismo contenido de Cu(II) (1 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$), utilizando las condiciones optimizadas previamente, resultando ser: $s_m^2 = 4,25\cdot 10^{-6}$. Con este valor de varianza y el correspondiente a cada simplex se calculaban los distintos valores de F y se comparaban con el valor teórico ($F = 1,72$ para $p = 0,67$ y $V_1 = V_2 = 3$, tabla 1, Anexo I). El proceso de evaluación finalizó cuando para un determinado simplex la relación entre las varianzas fue menor que el valor teórico, encontrándose las condiciones óptimas en aquel experimento cuya respuesta fuera la más alta de entre los 4 que componían el simplex.

Una vez establecidas las condiciones en las que se iba a llevar a cabo el proceso de optimización multivariante, se comenzaron a realizar las distintas experiencias. Así, en la tabla 4.7 se muestran los valores para cada una de las variables de los 4 experimentos que constituían el simplex inicial. En todos los casos se medía la absorbancia de una muestra que contenía 1 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ Cu(II) .

Análisis de cobre en muestras acuosas

Tabla 4.7. Valores del símplex inicial. V: volumen de muestra; L: longitud del tubo de reacción; Q: caudal del transportador.

Vértice	V (μL)	L (m)	Q ($\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$)
1	166	3,98	1,74
2	166	1,98	3,16
3	566	1,98	1,74
4	566	3,98	3,16

Tras la realización de los mismos, y aplicando las reglas del método símplex modificado para la obtención de las coordenadas del siguiente vértice, se realizaron los experimentos que se muestran en la tabla 4.8.

Tabla 4.8. Resultados de la optimización símplex para las variables que controlan el sistema. I: Símplex inicial; R: Reflexión; C⁺: Contracción positiva.

Vértice	V (μL)	L (m)	Q ($\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$)	A	Tipo
1	166	3,98	1,74	0,056	I
2	166	1,98	3,16	0,065	I
3	566	1,98	1,74	0,073	I
4	566	3,98	3,16	0,074	I
5	699	1,31	3,63	0,076	R
6	1055	2,87	2,52	0,075	R
7	833	2,65	2,67	0,076	C ⁺
8	833	3,31	4,56	0,076	R
9	766	2,98	3,85	0,070	C ⁺

En la tabla 4.9 se muestran los valores obtenidos para cada uno de los símplex que se iban formando en el proceso de optimización. Como se puede observar, en el símplex número tres el valor de F calculado (0,53) fue menor que el teórico, lo cuál indicaba que las variaciones de las respuestas surgían como consecuencia de errores aleatorios y, por tanto, se había alcanzado el máximo. Éste se encontraba formado por los experimentos 3, 4, 5 y 7 y, como se puede observar, el valor más alto de absorbancia (función respuesta) se obtenía para los experimentos 5 y 7. No obstante, las medidas

CAPÍTULO 4

obtenidas en las condiciones del experimento 5 mostraban mejor precisión, por lo que las condiciones óptimas seleccionadas fueron las correspondientes al mismo: Volumen de muestra: 699 μL , longitud del tubo de reacción: 1,31 m y caudal del transportador: 3,63 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$.

Tabla 4.9. Progreso del *símplex*. A: absorbancia media del *símplex*; S_s^2 : Varianza del *símplex*

Nº <i>símplex</i>	Experimentos	A	S_s^2	F (S_s^2/s^2)
1	1, 2, 3 y 4	0,067	$7,00\cdot 10^{-5}$	16,47
2	2, 3, 4 y 5	0,072	$2,33\cdot 10^{-5}$	5,49
3	3, 4, 5 y 7	0,075	$2,25\cdot 10^{-6}$	0,53
4	4, 5, 7 y 9	0,074	$6,33\cdot 10^{-6}$	1,49

Las condiciones óptimas que se alcanzaron mediante la optimización *símplex* dieron lugar a valores de absorbancia para la muestra semejantes a los que se obtenían mediante la optimización univariante. En esta ocasión, los valores de las tres variables optimizadas eran superiores a los obtenidos mediante la etapa previa de pre-optimización. Este hecho puede justificarse por las siguientes razones:

1ª. En la optimización univariante se obtuvieron valores de absorbancia prácticamente constantes tanto para la longitud del tubo de reacción como para el caudal de reactivo. Esto indicaba que para un volumen de muestra fijo, ambas variables no ejercían un efecto importante sobre el comportamiento del sistema, dentro de los intervalos estudiados.

2ª. El volumen de muestra era la única variable que afectaba al comportamiento del sistema en la etapa de pre-optimización. No obstante, a partir del volumen seleccionado como óptimo los valores que se obtenían para la absorbancia eran prácticamente constantes, por lo que se podría haber seleccionado un volumen mayor. El criterio utilizado para dicha elección se basó en un menor consumo de muestra por análisis, lo cual estaba directamente relacionado con un menor consumo de reactivos.

3ª. Cuando se estudió el efecto que producía sobre el comportamiento del sistema la variación simultánea de las tres variables utilizando la optimización multivariante, la respuesta que se obtuvo estaba en consonancia con la obtenida previamente. En la tabla 4.8 se puede observar cómo al aumentar el volumen de muestra para los 4 primeros experimentos se obtiene un aumento de la absorbancia medida, independientemente de los valores asignados a la longitud del tubo de reacción y al caudal del transportador. No obstante, para los experimentos siguientes el valor de la absorbancia se mantenía prácticamente constante como consecuencia de que los volúmenes de muestra necesarios ya se encontraban en la zona en el que éste no afectaba al comportamiento del sistema.

En resumen, las condiciones optimizadas utilizando el método de optimización *símplex* mostraron valores superiores para las tres variables respecto de los que se obtuvieron para las mismas mediante la optimización univariante. Además, las respuestas obtenidas en ambos casos eran prácticamente las mismas. Dado que la optimización multivariante tenía en cuenta los efectos producidos sobre el sistema cuando se variaban simultáneamente todas las variables, para las siguientes experiencias que se llevaron a cabo se emplearon las condiciones optimizadas en el *símplex*, es decir:

Volumen de muestra: 699 μL .

Longitud del tubo de reacción: 1,31 m.

Caudal del transportador: 3,63 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$.

3.2.4. Validación del método

Después de la obtención de las condiciones óptimas para el nuevo sistema de análisis por inyección en flujo desarrollado, y antes de proceder a su acoplamiento al sistema de membrana líquida de volumen, se validó el método estudiando el intervalo de concentración de cobre para el cual la relación entre ésta y la absorbancia era lineal, los límites de detección y cuantificación así como la precisión.

A continuación se muestran los resultados que se obtuvieron.

CAPÍTULO 4

Intervalo de linealidad

En esta ocasión se prepararon una serie de disoluciones de ácido nítrico 2,13 mol·L⁻¹ en las que se variaba la concentración final de cobre y posteriormente se realizaba la medida espectrofotométrica de las mismas a 370 nm frente a su blanco correspondiente. En la figura 4.16 se muestran los resultados obtenidos, los cuales mantenían un comportamiento lineal hasta 25 mg·L⁻¹ Cu(II). Dicha concentración marcaba, por tanto, el final del intervalo de aplicabilidad.

En este intervalo, la ecuación de ajuste para la recta de calibrado que regía el comportamiento del sistema tenía la siguiente expresión:

$$A = 0,062 (\pm 0,001) [\text{Cu(II)}] + 0,015 (\pm 0,014) \quad r^2 = 0,9987$$

En dicha ecuación, los intervalos de confianza para la pendiente y la ordenada en el origen se calcularon como ts_a y ts_b , siendo s_b y s_a las desviaciones estándar relativas para la pendiente y la ordenada en el origen, respectivamente, y t es el parámetro de la distribución de Student para $n-2$ grados de libertad al 95% de confianza ($p = 0,05$).

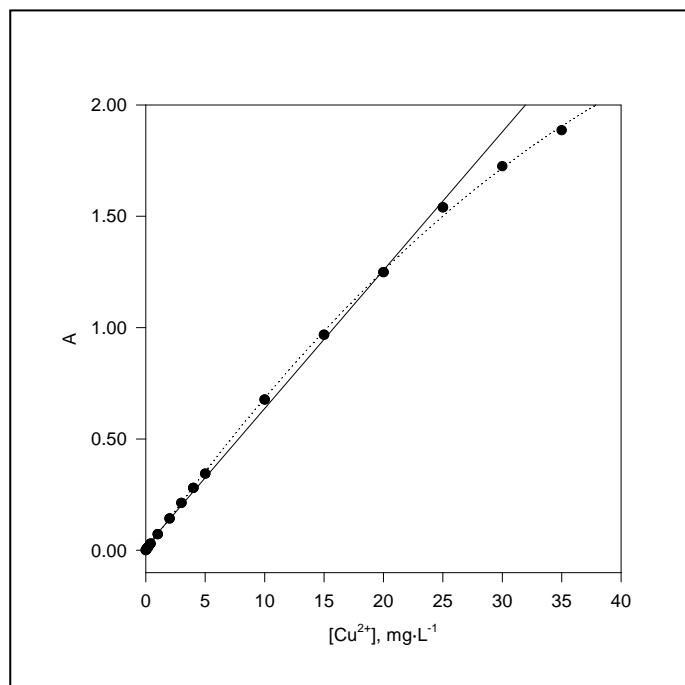


Figura 4.16. Intervalo de linealidad para Cu(II). [dPKBH] = $3,25 \cdot 10^{-4}$ mol·L⁻¹; [NH₄Cl/NH₃] = 0,85 mol·L⁻¹; 10% etanol.

Límites de detección y de cuantificación

Igual que en ocasiones anteriores, se procedió al cálculo del límite de detección del método construyendo diversas rectas de calibrado en las que se variaba la concentración de cobre en las disoluciones. En la tabla 4.10 se muestran los parámetros de ajuste de las rectas de regresión obtenidas para los diferentes intervalos de concentración estudiados. Cada una de ellas se construyó con al menos cinco puntos, realizándose las medidas por triplicado para cada uno de ellos. Para calcular el límite de detección se utilizó el criterio del cociente entre tres veces la desviación estándar de la ordenada en el origen y la pendiente de la recta, obteniéndose un valor de **12 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$** para el sistema FIA desarrollado. Este valor resulta del mismo orden de magnitud que el que se obtuvo en la puesta a punto del sistema FIA anterior, indicando una buena sensibilidad para éste.

Por otra parte, el límite de cuantificación obtenido fue de **41,7 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$** .

Tabla 4.10. Intervalos de concentración empleados para calcular el límite de detección.

Intervalo ($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$)	Ordenada en el origen	Pendiente	R²	^as_a	^as_b	L.D. ($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$)
0 – 2	$7,7\cdot 10^{-4}$	0,071	0,999	0,0009	0,0008	0,036
0 - 1	$5,5\cdot 10^{-4}$	0,072	0,999	0,0003	0,0006	0,012
0 - 0,4	$6,6\cdot 10^{-3}$	0,052	0,997	0,0003	0,0015	0,018

^a s_a y s_b son las desviaciones estándar de la ordenada en el origen y la pendiente, respectivamente.

Precisión

Por último, se calculó la precisión del método analizando en las condiciones ya optimizadas once disoluciones de ácido nítrico 2,13 mol·L⁻¹ que contenían 1 mg·L⁻¹ Cu(II) cada una. Los resultados que se obtuvieron se muestran en la figura 4.17, reflejando una buena repetitividad en las medidas y, por tanto, la adecuación del sistema desarrollado. El valor de la desviación estándar relativa para estas condiciones fue:, lo cual.

R.S.D. = 1,20%

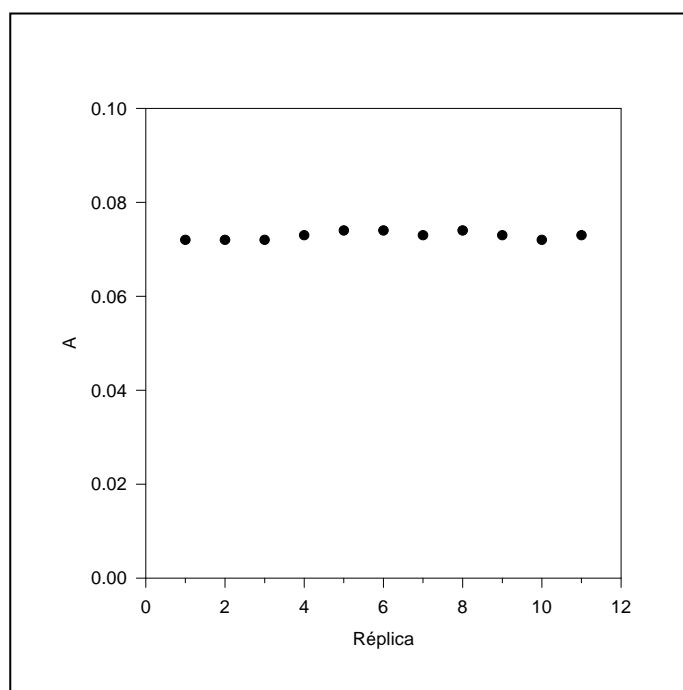


Figura 4.17. Precisión del método.

3.2.5. Sistema de Membrana Líquida de Volumen

Una vez que se obtuvieron las condiciones químicas e hidrodinámicas más favorables para que se pudiera acoplar el sistema de análisis por inyección en flujo al sistema de membrana líquida de volumen, se procedió a realizar el estudio sobre éste último. Como ya se mencionó al principio de este capítulo, el sistema de membrana líquida que se iba a utilizar consistía en dos vasos concéntricos en los que se depositaban las disoluciones cargada (disoluciones conteniendo el analito) y receptora (ácido nítrico $2,13 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$) unidas por una disolución orgánica (que actuaba como membrana) de ácido di-2-etilhexilfosfórico (dEHPA) disuelto en keroseno, como se mostraba en la figura 4.5.

Eficacia del sistema de membrana líquida

Para cuantificar la eficacia del transporte de Cu(II) a través de la membrana líquida se eligió la permeabilidad, empleándose las condiciones experimentales que se muestran en la tabla 4.11. Las distintas experiencias se realizaron con agitación simultánea de ambas fases acuosas mediante un agitador magnético a 1.000 rpm,

Análisis de cobre en muestras acuosas

calculándose la concentración de Cu(II) en cada una de ellas periódicamente mediante determinación espectrofotométrica utilizando el sistema FIA previamente optimizado, y que se mostraba en la figura 4.12.

Tabla 4.11. Condiciones utilizadas en las experiencias de Membrana Líquida de Volumen.

<u>Disolución cargada</u>	<u>Membrana</u>	<u>Disolución receptora</u>
V = 48 mL	V = 7 mL	V = 8,5 mL
0,5 mg·L ⁻¹ Cu(II)	144 mmol·L ⁻¹ dEHPA	2,13 mol·L ⁻¹ HNO ₃
35 g·L ⁻¹ NaCl	Keroseno	
pH = 5		

Los experimentos se realizaron durante 120 minutos, tomando medidas de absorbancia de la disolución receptora cada 30 minutos. Para el sistema empleado el área de la membrana (que en este caso se trataba de una corona circular) era de 12,94 cm², obteniéndose un valor para el coeficiente de permeabilidad de $P = 0,0295 \pm 0,0032$ cm·min⁻¹.

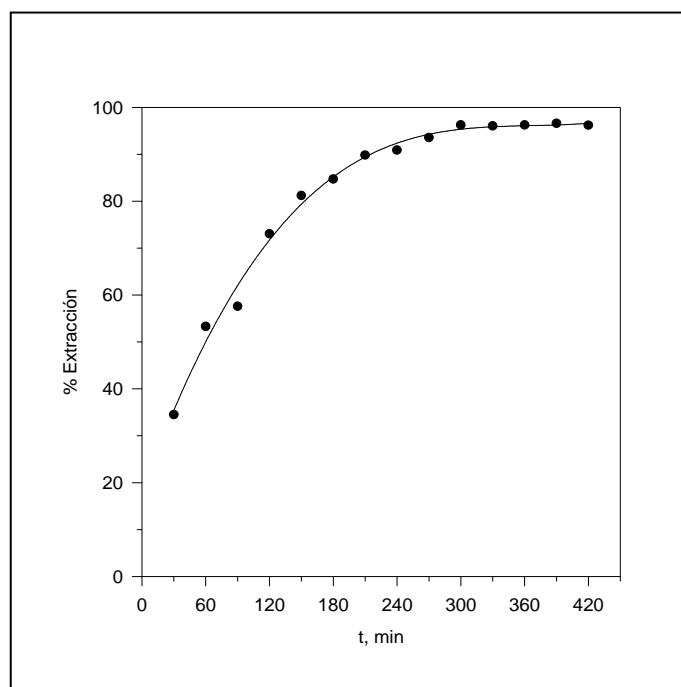


Figura 4.18. Extracción de cobre en función del tiempo con el sistema de Membrana Líquida de Volumen.

CAPÍTULO 4

Cuando se prolongaron los tiempos de cada experimento hasta los 420 minutos, se observó un aumento progresivo en el porcentaje de extracción hasta 330 minutos, momento a partir del cual éste permanecía prácticamente constante. En la figura 4.18 se muestran los resultados obtenidos. Para un tiempo de agitación de 330 minutos, el porcentaje de extracción que se obtuvo fue 96,24%. En estas condiciones, y considerando las características del diseño del sistema de membrana utilizado, se obtuvo un factor de preconcentración para el ión metálico de 5,43.

Aplicación

Una vez que se obtuvieron las condiciones más adecuadas para que tuviera lugar el proceso de preconcentración del ión metálico, se procedió a verificar la aplicabilidad del sistema. Para ello, se prepararon diversas disoluciones con un contenido salino de 35 y con distintas concentraciones de Cu(II) ajustando previamente su pH a 5 mediante la adición de una disolución reguladora NaAc/HAc $0,43 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$. Transcurridos los 330 minutos de agitación, se realizaba la correspondiente medida espectrofotométrica a 370 nm con el sistema FIA acoplado. Cada disolución se medía al menos por triplicado, mostrándose los resultados que se obtuvieron en la tabla 4.12. En ésta aparecen, además de la desviación estándar (s) para las medidas y el error relativo cometido, los valores para el parámetro t de la distribución de Student calculados para comparar los resultados experimentales con los valores de concentración iniciales. Este parámetro adopta un valor de 4,30 para 2 grados de libertad y una probabilidad del 95%. Como se puede observar, en ningún caso se obtienen valores superiores al tabulado, lo que indica que no existen diferencias estadísticamente significativas entre los resultados. Esto quiere decir que no se aprecian errores sistemáticos en el sistema desarrollado.

Tabla 4.12. Resultados obtenidos para distintas disoluciones de Cu(II) con el sistema desarrollado.

[Cu(II)] _{ini} , mg·L ⁻¹	[Cu(II)] _{encs} , mg·L ⁻¹	s	ε _r (%)	t
0,500	0,503	0,006	0,6	2,6
0,300	0,304	0,002	1,3	3,5
0,100	0,102	0,002	2,0	1,7
0,020	0,018	0,002	-10,0	1,7

3.3. MÉTODO DE PRECONCENTRACIÓN POR TÉCNICAS EXTRACTIVAS MEDIANTE EL USO DE 1,2-CHBBH

A continuación se muestran los resultados obtenidos para la determinación de cobre siguiendo el procedimiento descrito en el apartado 2.3 de este capítulo.

3.3.1. Ensayos Preliminares

Para que el reactivo pudiera utilizarse como agente extractante de cobre era necesario que éste se encontrara disuelto en un disolvente apropiado. En este sentido, de los distintos disolventes que se ensayaron (keroseno, xileno y tolueno), se comprobó que la solubilidad del reactivo decrecía siguiendo el orden: tolueno > keroseno > xileno. Por tanto, se seleccionó tolueno como el disolvente más apropiado para preparar las disoluciones del reactivo. Además, se observó que la adición de un pequeño volumen de dimetilformamida (DMF) antes del disolvente seleccionado favorecía aún más la solubilidad. Así, se encontró que adicionando un porcentaje final de DMF del 2% (v/v) antes del tolueno era suficiente para preparar disoluciones adecuadas del reactivo. Por tanto, en adelante todos los ensayos se realizaron preparando disoluciones de 1,2-CHBBH disuelto en tolueno y con un 2% (v/v) de dimetilformamida.

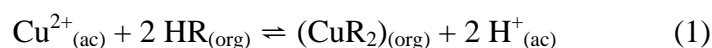
Una vez que se seleccionó el disolvente más apropiado, se realizaron una serie de ensayos previos para confirmar la extracción de cobre. Para ello, se preparó una disolución de 1,2-CHBBH en tolueno y 2% (v/v) de DMF cuya concentración garantizara que éste se encontraba en todo momento en exceso respecto de las disoluciones acuosas que contenían cobre ($1 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$). En este sentido, se seleccionó como adecuada una concentración de reactivo $2,57\cdot 10^{-3} \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$. A continuación, y tras llevar a cabo la extracción mediante agitación manual durante 5-15 minutos, se medía la fase acuosa resultante mediante espectroscopía de absorción atómica de llama. Así, se comparaban los valores de absorbancia obtenidos para cada una de las disoluciones acuosas ensayadas, una vez restados sus blancos correspondientes, con los de disoluciones que contenían $1 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1} \text{ Cu(II)}$. Los resultados indicaban, en general, un aumento progresivo en la cantidad de cobre extraído con el tiempo de agitación. No obstante, en ningún caso se obtuvieron porcentajes de extracción superiores al 60%, lo

CAPÍTULO 4

cual indicaba que en esas condiciones aún no se había alcanzado el equilibrio. Además, para cada tiempo ensayado, los valores encontrados para las distintas réplicas presentaban una gran variabilidad, por lo que para realizar los ensayos posteriores se decidió utilizar la agitación mecánica de los tubos así como un tiempo de agitación de los mismos de una hora.

3.3.2. Extracción de cobre

De manera general, la extracción de iones cobre de una disolución acuosa por agentes quelatantes puede representarse por el siguiente equilibrio:



en el que los subíndices “*ac*” y “*org*” se refieren a las disoluciones acuosas y orgánicas, respectivamente. El reactivo orgánico, 1,2-CHBBH en nuestro caso, se representa por HR, mientras que el complejo de cobre formado, por CuR₂. En las condiciones adecuadas, será posible desplazar el equilibrio (1) hacia la formación del complejo mediante una reacción de intercambio de ligandos. En ésta, se producirá la sustitución de las moléculas de agua de la esfera de coordinación del ión cobre (seis, no indicadas en la reacción para simplificar) por moléculas del reactivo orgánico. De este modo, el complejo formado será soluble en la disolución orgánica.

A continuación se describen los resultados obtenidos para la puesta a punto de un método de extracción de cobre utilizando 1,2-CHBBH como reactivo extractante.

Pre-optimización univariante

En esta primera etapa del estudio se realizaron diversas experiencias encaminadas a comprobar cómo le afectaba al proceso de extracción la variación de una variable cada vez mientras se mantenían constantes las restantes. Como ya se ha mencionado, éstas fueron el pH de la disolución acuosa, la concentración de reactivo (1,2-CHBBH), el tiempo de agitación y la salinidad de la disolución acuosa. A continuación se muestran los resultados obtenidos.

Efecto del pH de la disolución acuosa

Para comprobar cómo afectaba esta variable al sistema de extracción, se prepararon distintas disoluciones acuosas que contenían $1 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ Cu(II) pero a las que se variaba su pH en el intervalo comprendido entre 1 y 11 mediante la adición de pequeños volúmenes de ácido nítrico (HNO_3) ó hidróxido sódico (NaOH) según fuese necesario. Del mismo modo se prepararon los correspondientes blancos, pero en ausencia de cobre. Para realizar estas experiencias se utilizaron dos concentraciones de reactivo diferentes: $1,57\cdot 10^{-5} \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ y $1,57\cdot 10^{-4} \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$, que suponían relaciones molares 1:1 y 1:10 con las disoluciones acuosas, respectivamente.

Una vez preparadas las disoluciones, se tomaban alícuotas del mismo volumen de sendas disoluciones acuosas y orgánicas y se procedía como se indicaba en el apartado 2.3.2. Inicialmente, y antes de comenzar la agitación, se observaba cómo las disoluciones que poseían un valor de pH más elevado provocaban un aumento en la intensidad de la coloración amarilla de las disoluciones de reactivo con las que entraban en contacto. Este hecho ya evidenciaba la posibilidad de que el proceso de extracción fuese más completo a medida que aumentara el pH de las disoluciones acuosas.

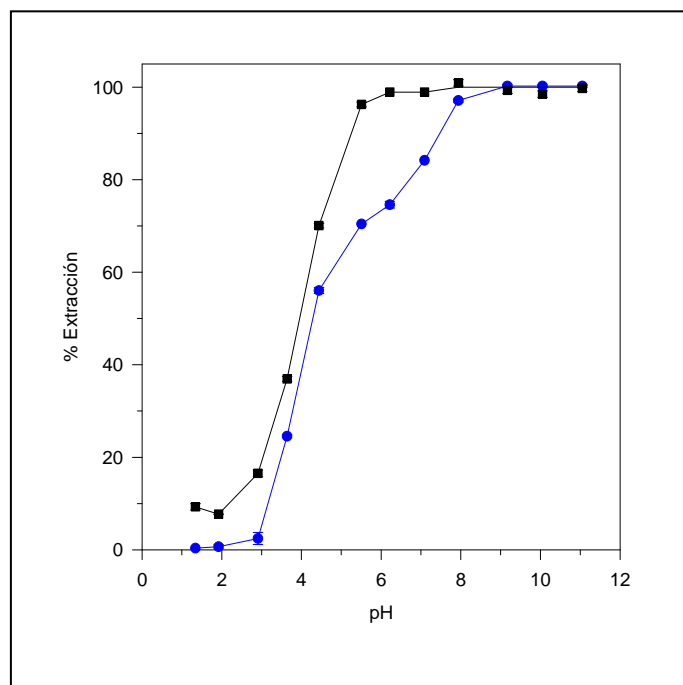


Figura 4.19. Influencia del pH en la extracción de $1 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ Cu(II). Tiempo de agitación: 60 minutos. Velocidad de agitación: 40 tpm. ● Relación molar 1:1 (Cu:1,2-CHBBH). ■ Relación molar 1:10 (Cu:1,2-CHBBH).

CAPÍTULO 4

Los resultados obtenidos se muestran en la figura 4.19, representando las barras verticales la desviación estándar de los valores obtenidos al efectuar medidas por triplicado de muestras duplicadas. En ésta se puede observar que cuando el reactivo se encontraba en exceso respecto del cobre la extracción era prácticamente completa a partir de pH 6. Por otra parte, si el reactivo no se encontraba en exceso respecto del cobre no se alcanzaba el 100% de extracción hasta valores de pH superiores a 8. Estos hechos confirmaban las sospechas iniciales cuando se ponían en contacto ambas disoluciones: la extracción del analito tendrá lugar en mayor extensión para valores de pH más altos.

Por tanto, para valores de pH superiores a 6 y con exceso de reactivo, la extracción de $1 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1} \text{ Cu(II)}$ será completa.

Efecto de la concentración de 1,2-CHBBH

Como se ha mostrado en el apartado anterior, la eficacia del proceso de extracción no depende sólo de la acidez de las disoluciones acuosas que contienen el analito sino también de la concentración de reactivo con la que se ponen en contacto. Por tanto, para estudiar el efecto que producía la concentración de reactivo en el proceso, se prepararon disoluciones de 1,2-CHBBH en tolueno y con un 2% v/v final de DMF a las que se varió su concentración final entre $1,7\cdot 10^{-5} \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ y $1,7\cdot 10^{-3} \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$, así como disoluciones acuosas de $1 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1} \text{ Cu(II)}$ a tres valores de pH diferentes (4, 6 y 8).

De los resultados que se obtuvieron, mostrados en la figura 4.20, se desprende, como cabía esperar, la dependencia que la extracción presenta frente al pH. En este sentido, para valores de pH básicos, se completa la extracción para valores de extractante más bajos, pues con $5,5\cdot 10^{-5} \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ de 1,2-CHBBH la extracción es ya cuantitativa.

Por otro lado, en todos los casos se observa un aumento progresivo del porcentaje de extracción con la concentración de 1,2-CHBBH. Así, para las disoluciones acuosas de pH 6, una concentración de reactivo $1,7\cdot 10^{-4} \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ es suficiente para obtener la extracción completa del analito, mientras que se necesita una

concentración más elevada, al menos $1,7 \cdot 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$, cuando el pH de la disolución acuosa es más ácido.

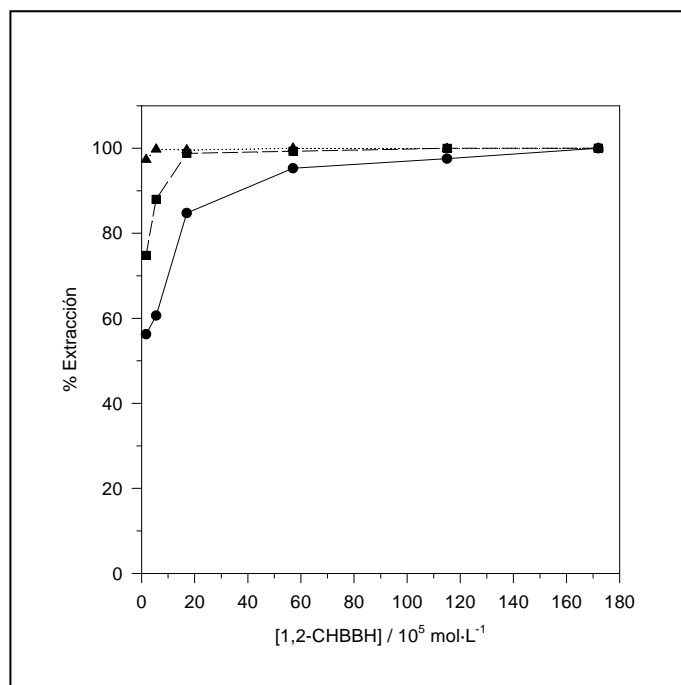


Figura 4.20. Influencia de la concentración de reactivo en la extracción. $[\text{Cu(II)}] = 1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ● pH 4; ■ pH 6; ▲ pH 8. Tiempo de agitación: 60 minutos. Velocidad de agitación: 40 tpm.

Por tanto, para obtener la máxima eficacia del proceso de extracción se puede utilizar una disolución de 1,2-CHBBH disuelta en tolueno y con un 2% v/v final de DMF de concentración $1,7 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ cuando las disoluciones acuosas que contienen el analito se encuentran a pH 6.

Influencia del tiempo de agitación

En los procesos de extracción líquido-líquido es necesario que ambas fases se mantengan en contacto durante un determinado periodo de tiempo para que se alcance el equilibrio. En este sentido, para comprobar cómo afectaba el tiempo de agitación al proceso de extracción, se realizaron medidas de la concentración de cobre en las disoluciones acuosas resultantes desde 5 minutos hasta 3 horas mediante espectroscopía de absorción atómica de llama.

CAPÍTULO 4

En este momento cabe señalar que las disoluciones que se emplearon se prepararon teniendo en cuenta las condiciones previamente optimizadas. Así, se usó como fase acuosa una disolución de pH 6 que contenía $1 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ Cu(II) mientras que la fase orgánica consistía en una disolución de 1,2-CHBBH $1,7\cdot 10^{-4} \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$.

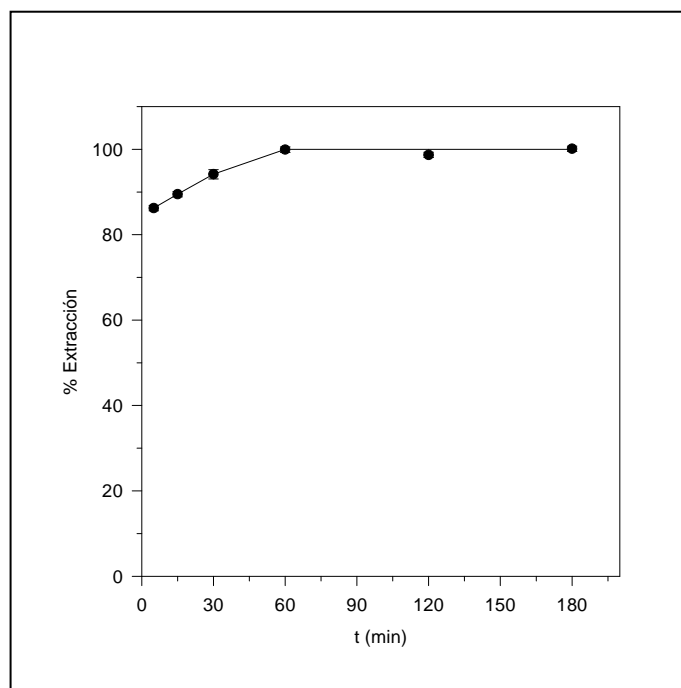


Figura 4.21. Influencia del tiempo de agitación en la extracción. $[\text{Cu(II)}] = 1 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ pH = 6; $[1,2\text{-CHBBH}] = 0,17 \text{ mM}$; Vel. de agitación = 40 tpm.

En la figura 4.21 se muestran los resultados, indicando las barras verticales la desviación estándar de los valores obtenidos. Como se puede observar, a medida que aumenta el tiempo de agitación se incrementa la eficacia del proceso, siendo ésta máxima a partir de una hora, momento en el cual todo el cobre habría pasado desde la fase acuosa a la orgánica.

Influencia de la salinidad

Una vez que se obtuvieron las condiciones más favorables para que tuviera lugar el proceso de extracción de cobre en disoluciones acuosas, se procedió a verificar su aplicabilidad a disoluciones salinas. Para ello, utilizando las condiciones previamente optimizadas, se llevó a cabo el procedimiento de extracción empleando disoluciones que

Análisis de cobre en muestras acuosas

contenían $1 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ Cu(II) a pH 6 pero en las que su concentración salina variaba entre 0 y $35 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ de NaCl.

En esta ocasión, para efectuar las medidas espectroscópicas se utilizaron rectas de calibrado en las que los patrones estaban preparados conteniendo la misma concentración en NaCl que las disoluciones ensayadas.

En la figura 4.22 se muestran los resultados que se obtuvieron, indicando de nuevo las barras verticales la desviación estándar de las medidas efectuadas.

Como se puede observar, el comportamiento del sistema de extracción resulta ser independiente de la salinidad, consiguiéndose prácticamente la máxima eficacia incluso para las disoluciones con salinidad más elevada, y verificándose con ello la aplicabilidad a todo tipo de aguas naturales, estuáricas, marinas, etc.

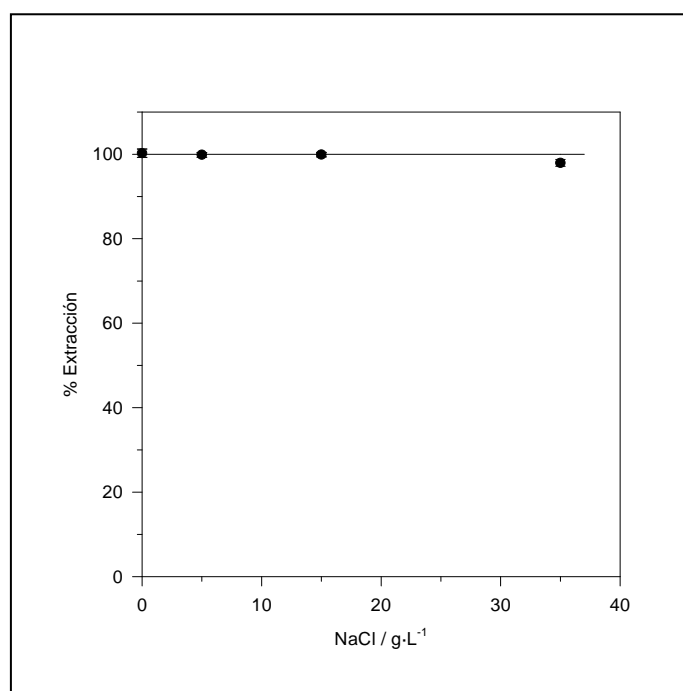


Figura 4.22. Influencia de la salinidad en la extracción.
[Cu(II)] = $1 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$; [1,2-CHBBH] = $1,7\cdot 10^{-4} \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$; Tiempo de agitación: 60 min; Velocidad de agitación: 40 tpm.

Una vez concluída esta primera etapa, las condiciones más favorables para el proceso de extracción de cobre con 1,2-CHBBH son las que se indican a continuación:

CAPÍTULO 4

pH de la disolución acuosa: 6

$[1,2\text{-CHBBH}] = 1,7 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$

Tiempo de agitación: 60 minutos

Optimización Multivariante

Los estudios efectuados para llevar a cabo la optimización univariante han puesto de manifiesto que las variables optimizadas están muy relacionadas, por lo que se requiere una optimización multivariante para considerar las interacciones entre ellas. En este sentido, se optó por el diseño de experimentos para realizar la optimización. Esta herramienta estadística permite evaluar el comportamiento de un sistema cuando se modifican al mismo tiempo varias variables, permitiendo con ello tener en cuenta sus interacciones. Además, si se posee un conocimiento previo sobre la región de cada una de las variables donde pueden encontrarse las condiciones óptimas del sistema, seleccionando adecuadamente el tipo de diseño y los niveles para cada una será posible alcanzarlas mediante la realización de un número pequeño de experimentos. En el caso que nos ocupa, se estudiaron las mismas variables que en la etapa anterior, esto es: pH de la disolución acuosa, salinidad de la misma, tiempo de agitación y concentración de reactivo. En este instante hay que indicar que, aunque en el estudio precedente se ha mostrado que la extracción de analito es prácticamente independiente de la salinidad, se mantiene en éste para comprobar las posibles interacciones entre las variables. Para llevar a cabo el estudio se optó por el diseño *central compuesto de segundo orden* (ver Anexo II). En nuestro caso, éste se encuentra formado por un factorial 2^4 al que se le han adicionado 8 (2x4) puntos axiales y 3 puntos centrales. Así, para cada variable se definieron cinco niveles, que empleando la notación codificada se correspondían con los valores: -2, -1, 0, 1 y 2. En ésta, los niveles -1 y 1 se correspondían con los valores bajos y altos, respectivamente, para cada variable del diseño factorial; el nivel 0 se asignaba para los valores centrales y, los niveles -2 y 2 se obtenían para los puntos axiales. Estos últimos se calculaban para satisfacer la condición de rotabilidad en este tipo de diseños, en los que la distancia desde el centro hasta cada uno de los puntos axiales se determina como $\alpha = (n)^{1/4}$, donde n indica el número de experiencias para el factorial (16 en nuestro caso).

Análisis de cobre en muestras acuosas

De este modo se cubría de una manera amplia los intervalos estudiados para cada variable en el proceso de pre-optimización univariante. En la tabla 4.13 se muestran los valores asignados a cada una de las variables para los distintos niveles que se adoptaron.

Tabla 4.13. Valores de las distintas variables para el diseño de experimentos.

Variables	Niveles				
	-2	-1	0	1	2
pH	1	3	5	7	9
[1,2-CHBBH] (mM)	0,015	0,065	0,115	0,165	0,215
t. agitación (min)	20	40	60	80	100
Salinidad ($\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ NaCl)	0	10	20	30	40

Una vez seleccionados los niveles para cada una de las variables, se utilizó el programa estadístico Statgraphics Plus 5.1 para llevar a cabo la optimización. Este paquete estadístico ofrece la posibilidad de seleccionar entre un gran número de procesos de optimización multivariante. En nuestro caso, se optó por el análisis de la Superficie de Respuesta, llevando a cabo un diseño Central Compuesto, para el cual fue necesario realizar los 27 experimentos que se muestran en la tabla 4.14. En ésta, se indica en la primera columna el orden en el que fueron realizadas cada una de las experiencias, de acuerdo con el orden aleatorio que proporcionó el propio programa. De este modo se trataba de garantizar la ausencia de correlaciones en los resultados como consecuencia del orden en el que se realizaban cada una de las experiencias. En las cuatro columnas siguientes se muestran los valores codificados que adoptaban cada una de las variables estudiadas.

CAPÍTULO 4

Tabla 4.14. Experiencias realizadas para el diseño de experimentos.

Experiencia	pH	[R]	t	Sal	Experiencia	pH	[R]	t	Sal
10	-1	-1	-1	-1	9	-1	1	1	1
20	1	-1	-1	-1	2	1	1	1	1
22	-1	1	-1	-1	6	0	0	0	0
17	1	1	-1	-1	11	0	0	0	0
4	-1	-1	1	-1	1	-2	0	0	0
13	1	-1	1	-1	23	2	0	0	0
12	-1	1	1	-1	27	0	-2	0	0
24	1	1	1	-1	19	0	2	0	0
3	-1	-1	-1	1	25	0	0	-2	0
5	1	-1	-1	1	14	0	0	2	0
15	-1	1	-1	1	18	0	0	0	-2
16	1	1	-1	1	8	0	0	0	2
26	-1	-1	1	1	21	0	0	0	0
7	1	-1	1	1					

Una vez establecidas, en la tabla 4.15 se muestran las condiciones reales en las que se realizaron cada uno de los experimentos, así como los resultados obtenidos, expresados como porcentajes de extracción. Estos valores representan la media de los resultados obtenidos al analizar, por triplicado, cada una de las muestras.

Para realizar cada una de las experiencias, se prepararon disoluciones acuosas que contenían $1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ Cu(II) a los valores de pH y concentración salina indicados, así como sus blancos correspondientes. De igual modo, se prepararon las disoluciones de reactivo y, a continuación, se procedía como se ha descrito anteriormente. Para realizar las medidas espectroscópicas, se prepararon rectas de calibrado que contenían la misma concentración salina que las muestras que se iban a analizar.

Análisis de cobre en muestras acuosas

Tabla 4.15. Resultados obtenidos para el diseño de experimentos.

Experiencia	pH	[1,2-CHBBH] / mM	t. agit. / min	Sal. /g·L ⁻¹ NaCl	% Extracción
1	1	0,115	60	20	4,18
2	7	0,165	80	30	94,44
3	3	0,065	40	30	11,79
4	3	0,065	80	10	13,47
5	7	0,065	40	30	94,44
6	5	0,115	60	20	95,66
7	7	0,065	80	30	94,05
8	5	0,115	60	40	89,63
9	3	0,165	80	30	20,95
10	3	0,065	40	10	15,42
11	5	0,115	60	20	96,09
12	3	0,165	80	10	28,32
13	7	0,065	80	10	96,35
14	5	0,115	100	20	95,22
15	3	0,165	40	30	20,95
16	7	0,165	40	30	94,05
17	7	0,165	40	10	96,75
18	5	0,115	60	0	99,41
19	5	0,215	60	20	93,09
20	7	0,065	40	10	96,35
21	5	0,115	60	20	95,23
22	3	0,165	40	10	24,81
23	9	0,115	60	20	92,20
24	7	0,165	80	10	96,75
25	5	0,115	20	20	94,37
26	3	0,065	80	30	11,80
27	5	0,015	60	20	81,51

Con estos datos, y haciendo uso del programa Statgraphics Plus 5.1, se realizó el análisis estadístico del diseño al objeto de obtener la máxima información posible sobre el proceso en estudio.

CAPÍTULO 4

En primer lugar, el programa proporciona información, que se muestra en la tabla 4.16, sobre los efectos estimados para cada una de las variables así como de sus interacciones en la respuesta, en nuestro caso el porcentaje de extracción. Éstos se representan mediante letras mayúsculas que identifican a cada variable o factor, y se definen como el cambio que se produce en la respuesta como consecuencia de un cambio en el nivel de ese factor, promediado sobre los niveles de los otros factores. En el caso de las interacciones, éstos se calculan como la diferencia promedio entre el efecto del primer factor en el nivel superior de los restantes y su efecto en el nivel inferior de éstos.

Tabla 4.16. Efectos estimados para el porcentaje de extracción.

Variable	Efecto estimado	Error de muestreo
A: pH	65,9758	± 7,9963
B: [CHBBH]	5,5425	± 7,9963
C: Tiempo	0,2725	± 7,9963
D: Salinidad	-3,7758	± 7,9963
AA	-31,8294	± 8,4813
AB	-5,2188	± 9,7934
AC	-0,1962	± 9,7934
AD	0,9138	± 9,7934
BB	-12,2744	± 8,4813
BC	0,7788	± 9,7934
BD	-0,8412	± 9,7934
CC	-8,5269	± 8,4813
CD	-0,1938	± 9,7934
DD	-8,6644	± 8,4813
Media	95,66	± 11,3085

De los resultados mostrados, se puede observar cómo la variable que tiene mayor influencia sobre la extracción es el pH de la disolución acuosa, y en menor medida la concentración de reactivo (con valores positivos). También cabe destacar los valores negativos que presentan las variaciones cuadráticas de todas las variables. Este

hecho indica que la superficie de respuesta obtenida para el modelo presentará una gráfica en forma de parábola invertida, lo que implica la existencia de un máximo. Este máximo se corresponderá con los valores de cada una de las variables que optimizan la respuesta del sistema, esto es, el porcentaje de extracción.

Otro modo de identificar cuáles son los efectos con mayor influencia sobre la respuesta es mediante la gráfica de Pareto. Ésta no es más que un gráfico de barras en el que se representan en orden decreciente de importancia los efectos estandarizados, los cuales se calculan como el cociente entre cada efecto estimado y su error de muestreo. Además, mediante una línea vertical se indica el valor del estadístico t para el número de grados de libertad y el nivel de significación elegido (habitualmente $\alpha = 0,05$), de tal modo que aquéllos efectos estandarizados que la sobrepasen serán significativos y, por tanto, tendrán influencia sobre la respuesta del sistema. En la figura 4.23 se muestra la gráfica que se obtuvo en este estudio.

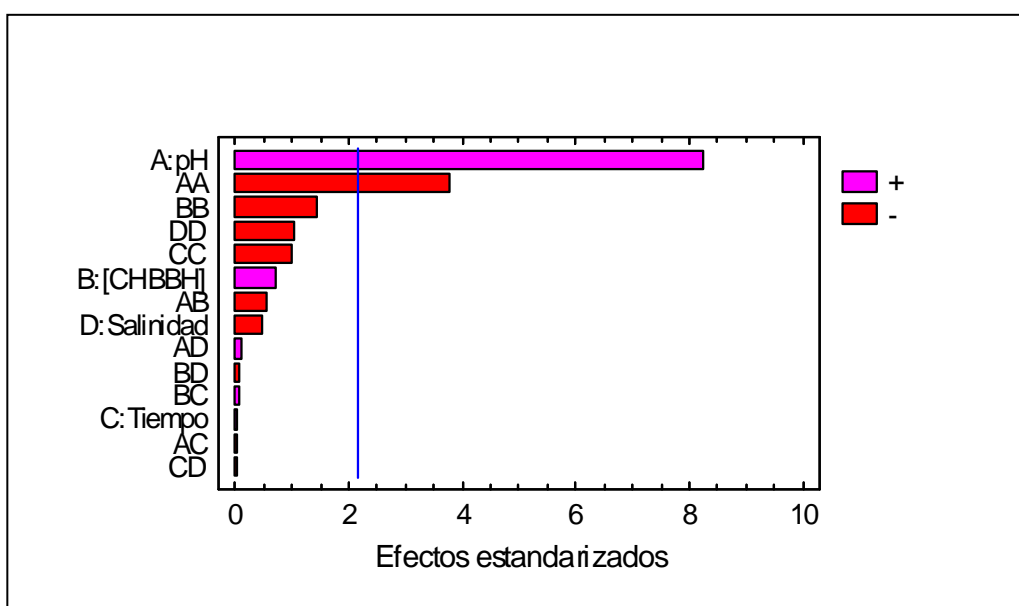


Figura 4.23. Efectos estandarizados en orden decreciente de importancia.

Como se puede observar, y como ya se ha indicado anteriormente, el pH de la disolución acuosa es la variable que mayor influencia tiene sobre el sistema de extracción, seguido de su variación cuadrática (en este caso de signo negativo). Este resultado también se observa para las variaciones cuadráticas de las restantes variables, aunque éstas sólo presentan una ligera influencia sobre la respuesta. En este sentido, sus

CAPÍTULO 4

efectos no se pueden considerar lo suficientemente significativos. Lo mismo ocurre para la concentración de reactivo así como su interacción con el pH. Para concluir, la salinidad de la disolución acuosa tiene una ligera influencia negativa sobre la extracción mientras que la influencia del tiempo de agitación es prácticamente nula.

Una vez analizada esta información preliminar, se pasó al estudio de los resultados que proporcionaba el análisis de la varianza, y que se muestran en la tabla 4.17.

Tabla 4.17. Resultados obtenidos en el análisis de la varianza.

Variable	^a G.L.	^b S.C.	^c M.C.	F	p
A: pH	1	26116,9	26116,9	68,08	0,0000
B: [CHBBH]	1	184,316	184,316	0,48	0,5014
C: Tiempo	1	0,4455	0,4455	0,00	0,9734
D: Salinidad	1	85,542	85,542	0,22	0,6453
AA	1	5403,25	5403,25	14,08	0,0028
AB	1	108,941	108,941	0,28	0,6038
AC	1	0,15406	0,15406	0,00	0,9843
AD	1	3,3398	3,3398	0,01	0,9272
BB	1	803,522	803,522	2,09	0,1734
BC	1	2,4258	2,4258	0,01	0,9379
BD	1	2,8308	2,8308	0,01	0,9330
CC	1	387,774	387,774	1,01	0,3346
CD	1	0,1502	0,1502	0,00	0,9845
DD	1	400,381	400,381	1,04	0,3271
Error Total	12	4603,72	383,644		
Total (corr.)	26	36591,7			
R-cuadrado	87,4187%				
Error medio absoluto	10,0531				
Durbin-Watson	1,73279 (p = 0,0920)				

Nota: ^a Grados de libertad; ^b Suma de cuadrados; ^c Media de cuadrados.

De ésta cabe destacar la existencia de dos efectos (valores del estadístico *p* inferiores a 0,05) que son estadísticamente significativos a un nivel de probabilidad del

Análisis de cobre en muestras acuosas

95%: el pH y su variación cuadrática. Este hecho ratificaba de nuevo que, en las condiciones estudiadas, dicha variable era la que tenía mayor influencia sobre la respuesta del sistema. Además, el valor de 87,42% para el estadístico R-cuadrado, indicaba que el modelo que se había obtenido explicaba una proporción razonablemente grande de la variabilidad de la respuesta. Por último, hay que señalar que el estadístico de Durbin-Watson, que evalúa los residuales para determinar si hay alguna correlación significativa entre ellos basada en el orden en el que aparecen en el fichero de datos, presentaba un valor para el estadístico p superior a 0,05, lo cual indicaba que no existía correlación entre los residuales.

Seguidamente se obtuvo la ecuación de regresión que ajustaba al modelo, cuyos coeficientes se muestran en la tabla 4.18.

Tabla 4.18. Coeficientes de regresión para la superficie de respuesta.

Variable	Coeficiente	Variable	Coeficiente
Constante	95,66	AD	0,456875
A: pH	32,9879	BB	-6,13719
B: [CHBBH]	2,77125	BC	0,389375
C: Tiempo	0,13625	BD	-0,420625
D: Salinidad	-1,88792	CC	-4,26344
AA	-15,9147	CD	-0,096875
AB	-2,60937	DD	-4,33219
AC	-0,098125		

Como se puede observar, los coeficientes para las variaciones cuadráticas de todas las variables son negativos, lo que indica que la superficie de respuesta que se obtenga presentará un punto estacionario que, en esta ocasión, corresponderá a un máximo. Para tener una idea más adecuada del comportamiento del sistema es habitual recurrir a la representación gráfica de dicha ecuación, obteniéndose la correspondiente superficie de respuesta. Como ya se ha mencionado anteriormente, ésta debe presentar una forma parabólica abierta hacia abajo, indicando así que el punto estacionario de la

CAPÍTULO 4

misma representará un máximo. En la figura 4.24 se muestra la superficie de respuesta que se obtuvo en este estudio.

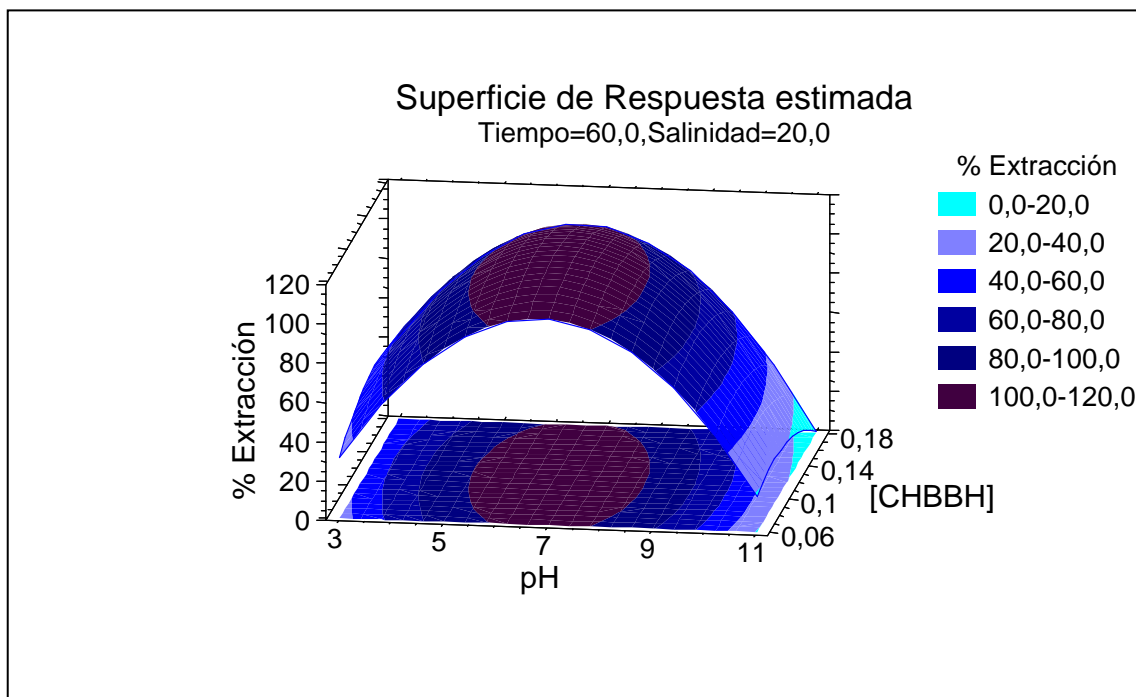


Figura 4.24. Superficie de respuesta obtenida para el porcentaje de extracción.

En este instante cabe señalar que la superficie de respuesta que se muestra es la obtenida cuando se mantienen constantes, y en sus valores centrales, las dos variables con menor influencia sobre la respuesta del sistema. Como ya se ha mencionado, dichas variables son la salinidad y el tiempo de agitación, de ahí que para representar la superficie de respuesta se utilicen el pH (la variable con mayor influencia) y la concentración de reactivo. Como se puede observar, la superficie de respuesta obtenida presenta la forma parabólica abierta hacia abajo que ya se había indicado anteriormente. Para obtener las condiciones del punto estacionario, es decir el óptimo del sistema, que se corresponde con el máximo de la función, habrá que calcular las derivadas parciales de la respuesta sobre cada una de las variables, igualar a cero y resolver el correspondiente sistema de ecuaciones para obtener los valores de cada una de ellas. En esta ocasión, el programa proporciona directamente dichos valores haciendo uso de la maximización de la respuesta del sistema. Así, la respuesta optimizada proporciona un valor para la extracción de **112,87%**, con los siguientes valores para cada una de las

Análisis de cobre en muestras acuosas

variables: **pH: 7,07**; **[CHBBH]: $1,16 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$** ; **tiempo: 60,12 minutos** y **salinidad: 18,36**. Como se puede observar, los resultados obtenidos conducen a un porcentaje de extracción superior al máximo que se puede obtener, esto es, 100%, por lo que dichos valores no pueden tomarse como adecuados. En este sentido, hay que indicar que dichos valores se obtienen mediante un cálculo meramente matemático, en el que no se tienen en cuenta las condiciones reales del sistema en estudio. Para estos casos, el programa permite introducir condiciones para la respuesta, en nuestro caso hay que indicar que la respuesta máxima no puede ser superior a 100%. Utilizando estas condiciones, el programa vuelve a calcular los valores para cada una de las variables que hacen que la respuesta sea el máximo establecido y, en estas circunstancias, las condiciones óptimas son:

pH de la disolución acuosa: 5,0

[1,2-CHBBH]: $1,15 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$

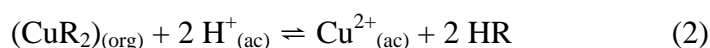
Tiempo de agitación: 60 minutos

Salinidad de la disolución acuosa: $20 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1} \text{ NaCl}$

Por tanto, en adelante se emplearán las condiciones anteriores, indicando que la salinidad de la disolución acuosa no influirá sobre la respuesta como se había obtenido también en la etapa de pre-optimización univariante.

3.3.3. Reextracción de cobre

Como se ha comentado anteriormente, para que tenga lugar el proceso de reextracción será necesario invertir el sentido de la reacción mostrada en (1). En este sentido, si se considera que en la disolución orgánica se encuentra todo el analito en forma de complejo, será necesario modificar las condiciones de acidez del sistema al objeto de desplazar el equilibrio hacia la obtención del analito libre en disolución acuosa. Por tanto, la adición de ácidos al sistema provocará la disociación del complejo, dando lugar al nuevo equilibrio:



CAPÍTULO 4

Una vez optimizadas las condiciones más favorables para que tuviera lugar el proceso de extracción de cobre en muestras acuosas de elevada salinidad utilizando como reactivo 1,2-CHBBH, se procedió al estudio de las condiciones más favorables para que tuviera lugar el proceso inverso. En este sentido, hay que señalar que este estudio se llevó a cabo con un doble objetivo: conseguir un factor de preconcentración de cobre más elevado y disponer de una matriz acuosa en la que cuantificar su concentración mediante espectroscopía de absorción atómica de llama. El primero es importante en el caso de muestras acuosas naturales, y particularmente las salinas, en las que la concentración de cobre es del orden de los $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$. Además, si se desea utilizar una técnica instrumental sencilla para cuantificarlo, como la espectroscopía de absorción atómica de llama, será necesario disponer de una disolución acuosa en la que la concentración del analito se encuentre por encima del límite de detección de ésta.

Para llevar a cabo este estudio se probaron cuatro ácidos inorgánicos, a saber: ácido nítrico, ácido sulfúrico, ácido clorhídrico y ácido perclórico. Además, de cada uno de ellos se prepararon cuatro disoluciones distintas cuyas concentraciones finales fueron $0,01\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$; $0,1\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$; $1\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ y $2\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$, respectivamente. Una vez preparadas, se llevaba a cabo el procedimiento descrito en 2.3.3. En la figura 4.25 se muestran los resultados que se obtuvieron para el proceso de reextracción. Como se puede observar, los tres primeros presentaban un comportamiento similar, obteniéndose la máxima capacidad de reextracción, en torno al 75%, cuando la concentración de éstos era $1\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$. En el caso del ácido perclórico, para todas las concentraciones ensayadas se obtuvieron porcentajes de reextracción más elevados que los anteriores y, a diferencia de éstos, para la concentración más alta estudiada se alcanzaba el porcentaje mayor, en esta ocasión del 90%.

Por tanto, para llevar a cabo el proceso de reextracción de cobre se utilizaría una disolución de HClO_4 $2\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$.

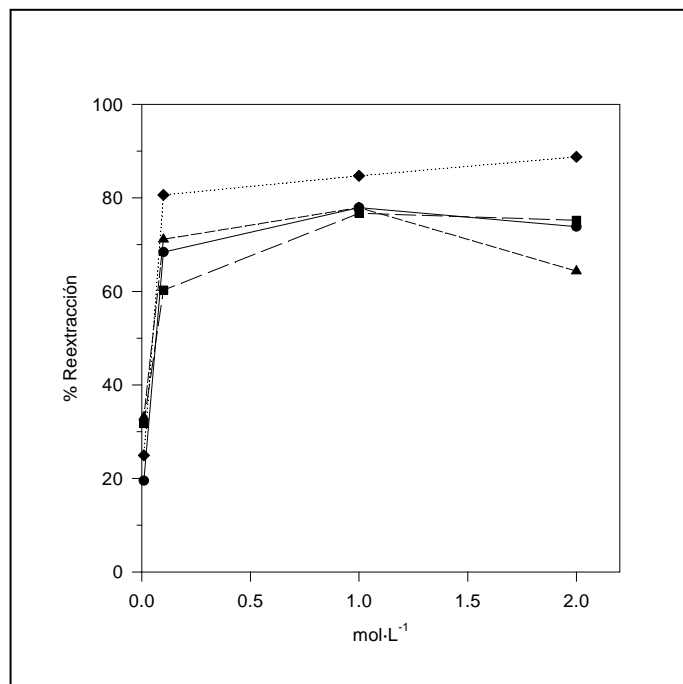


Figura 4.25. Eficacia de diferentes ácidos para la reextracción de cobre. ● HNO₃; ■ HCl; ▲ H₂SO₄; ◆ HClO₄. [Cu(II)] = 1 mg·L⁻¹; 35 g·L⁻¹ NaCl; [CHBBH] = 1,15·10⁻⁴ mol·L⁻¹; Tiempo agitación: 60 min; Velocidad agitación: 40 tpm.

Posteriormente, se varió la relación de volúmenes entre las disoluciones acuosa y orgánica para mejorar la eficacia en el proceso de preconcentración del analito. Hay que señalar en este punto que el volumen de disolución acuosa jugaba un papel determinante, ya que éste debía seleccionarse de manera que fuese lo suficientemente grande como para permitir su posterior análisis, al menos por triplicado, utilizando la espectroscopía de absorción atómica, y al mismo tiempo tan pequeño como fuera posible para obtener factores elevados de preconcentración de analito. Así, se realizó en primer lugar el proceso de extracción, en las condiciones óptimas, sobre una disolución de salinidad 35 que contenía 0,1 mg·L⁻¹ Cu(II). Posteriormente, se utilizaron 5 mL de disolución acuosa (HClO₄ 2 mol·L⁻¹) para la reextracción y se varió el volumen de la disolución orgánica obtenida previamente para disponer de relaciones desde 1:1 a 1:20 (V_{ac}:V_{org}). En todos los casos, teniendo en cuenta que se alcanzaba un 90% para la

CAPÍTULO 4

reextracción, los factores de preconcentración que se obtuvieron coincidían estrechamente con las relaciones volumétricas estudiadas.

3.3.4. Aplicación

Como aplicación del nuevo método se llevó a cabo el análisis de tres muestras reales con matrices diferentes para determinar su contenido en Cu(II). En la tabla 4.19 se muestra la concentración de los diferentes metales analizados en cada una de ellas así como la técnica empleada.

Así, de cada una de ellas se tomaron 3 alícuotas de 20 mL y se efectuó el proceso de extracción en las condiciones previamente optimizadas. Una vez concluido, las fases acuosas resultantes se almacenaron para verificar la ausencia de cobre tras medirlas por AAS. Para realizar la reextracción, las fases orgánicas correspondientes se unieron y a continuación se pusieron en contacto con la disolución de HClO_4 $2 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$.

Tabla 4.19. Concentración metálica de las muestras analizadas.

Muestra	Metal $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$	Técnica utilizada
Agua de Mar (Bahía de Cádiz)	Cu: 5,02 ($\pm 0,23$) Pb: 2,51 ($\pm 0,06$) Zn: 5,56 ($\pm 0,07$) Cd: 0,20 ($\pm 0,00$)	Voltamperometría de Redisolución Anódica
Agua de Mar (Bahía de Huelva)	Cu: 9,56 ($\pm 0,38$) Pb: 2,28 ($\pm 0,00$) Zn: 27,27 ($\pm 1,83$) Cd: 0,24 ($\pm 0,01$)	Voltamperometría de Redisolución Anódica
Agua potable	Cu: 13,21 ($\pm 0,44$) Zn: 30,90 ($\pm 0,23$) Fe: 41,07 ($\pm 0,23$) Al: 146,66 ($\pm 0,23$) Mn: 2,56 ($\pm 0,23$)	ICP-AES

Análisis de cobre en muestras acuosas

En la tabla 4.20 se muestran los resultados, apareciendo las concentraciones de cobre obtenidas con los métodos de referencia así como con el método aquí desarrollado para cada una de las muestras analizadas, mostrándose entre paréntesis la desviación estándar. Además, se indican el error relativo cometido y, en la última columna, el valor para el estadístico t de la distribución de Student cuando se comparan ambas medias. En todos los casos, el valor tabulado para éste con $\alpha = 0,05$ y cuatro grados de libertad ($n_1 + n_2 - 2$) vale 2,78.

Tabla 4.20. Resultados obtenidos en el análisis de Cu^{2+} en muestras reales.

Muestra	$[\text{Cu(II)}]_{\text{ref}} / \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$	$[\text{Cu(II)}]_{\text{ana}} / \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$	$\epsilon_r (\%)$	t
B. Cádiz	5,02 ($\pm 0,23$)	5,35 ($\pm 0,19$)	6,57	1,92
B. Huelva	9,56 ($\pm 0,38$)	9,62 ($\pm 0,13$)	0,63	0,26
Agua potable	13,21 ($\pm 0,44$)	12,99 ($\pm 1,13$)	-1,67	0,31

Como se puede observar, los errores relativos cometidos eran pequeños y, en los tres casos, los valores del parámetro t eran inferiores al tabulado, lo cual indicaba que no existían diferencias estadísticamente significativas entre las medias. Este hecho pone de manifiesto la ausencia de errores sistemáticos en nuestro método, y por tanto su aplicabilidad a muestras reales.

3.3.5. Utilización de 1,2-CHBBH como transportador de cobre en sistemas de membranas líquidas

En los estudios precedentes se ha demostrado la aplicabilidad del reactivo 1,2-CHBBH para la determinación de cobre en muestras acuosas de distinta composición mediante el proceso de extracción-reextracción. Por tanto, teniendo en cuenta las ventajas que presentan los sistemas de membranas líquidas si se comparan con los sistemas de extracción-reextracción, se procedió a estudiar el comportamiento de 1,2-CHBBH como transportador de cobre en un sistema de membrana líquida de volumen. Así, el objetivo con el que se pretendía abordar este estudio era doble: por una parte, reducir tanto el consumo de reactivos y disolventes como la excesiva manipulación de las muestras para evitar así posibles fuentes de contaminación y, por otra, desarrollar un

CAPÍTULO 4

sistema sencillo, fácil de manipular y transportar de modo que se pudiera utilizar *in situ* para determinar la concentración de cobre en muestras acuosas naturales. En este capítulo se ha mostrado cómo la espectrofotometría UV/Vis resultaba una técnica adecuada para el análisis de cobre en muestras acuosas naturales tras su acoplamiento a un sistema de membrana líquida de volumen. En este sentido, para llevar a cabo las distintas experiencias, se utilizaron las condiciones óptimas en las que se verificaban los procesos de extracción y reextracción de cobre utilizando 1,2-CHBBH así como las hidrodinámicas del sistema FIA acoplado a una membrana líquida de volumen. Dichas condiciones se indican en la tabla 4.21, empleándose el sistema acoplado que se mostró en la figura 4.12.

Tabla 4.21. Condiciones experimentales utilizadas.

Membrana Líquida	Sistema FIA
48 mL muestra pH: 5 8,5 mL HClO ₄ 2 mol·L ⁻¹ 7 mL 1,2-CHBBH 1,15·10 ⁻⁴ mol·L ⁻¹	Volumen de muestra: 699 µL Longitud tubo reacción: 1,31 m Caudal del transportador: 3,63 mL·min ⁻¹ [dPKBH]: 3,3·10 ⁻⁴ mol·L ⁻¹ λ : 370 nm

Una vez establecidas las condiciones iniciales, tanto químicas como hidrodinámicas del sistema acoplado, se realizaron los experimentos correspondientes. En este momento es preciso señalar que, como se mostraba en el capítulo 2 de la presente memoria, para cuantificar correctamente la concentración de cobre en muestras reales mediante la formación del complejo con dPKBH era necesario adicionar previamente agentes enmascarantes. Por tanto, aunque en los sistemas de extracción con disolvente no hay posibilidad de interferencias, éste no es el caso para el sistema en estudio, de ahí que cuando se analicen muestras reales a éstas se les adicionen previamente fluoruro amónico (0,04 mol·L⁻¹) y citrato sódico dihidratado (0,1 mol·L⁻¹) como enmascarantes.

En cada uno de los experimentos, se realizaron medidas por duplicado de la absorbancia a 370 nm de la disolución receptora, tras la formación del complejo

Análisis de cobre en muestras acuosas

dPKBH-Cu(II), cada 30 minutos, durante dos horas. En este instante hay que indicar que cada vez que se efectuaba una medida se retiraba un determinado volumen de la disolución receptora, por lo que para compensar dicha pérdida en el sistema FIA se utilizaba el canal adicional de transportador. Éste tiene una composición idéntica a la disolución receptora del sistema de membrana líquida, por lo que, después de cada inyección de muestra, la disolución que se introduce en el sistema de membrana líquida no produce contaminación alguna, tan sólo la dilución de la disolución receptora. Para compensar el efecto de esta dilución, provocado por la inyección de muestra (699 μL de disolución receptora), se llevó a cabo una corrección matemática mediante una hoja de cálculo (Microsoft Excel), desarrollada a tal efecto, en la que los valores sucesivos de absorbancia obtenidos se multiplicaban por el correspondiente factor de corrección. De este modo, se podía calcular en cada momento la cantidad de analito que quedaba en la disolución cargada y, por consiguiente, el porcentaje del mismo extraído.

En la figura 4.26 se muestran los resultados que se obtuvieron cuando se utilizó una muestra de agua potable, cuya concentración de cobre se había obtenido previamente mediante espectroscopía de absorción atómica de llama.

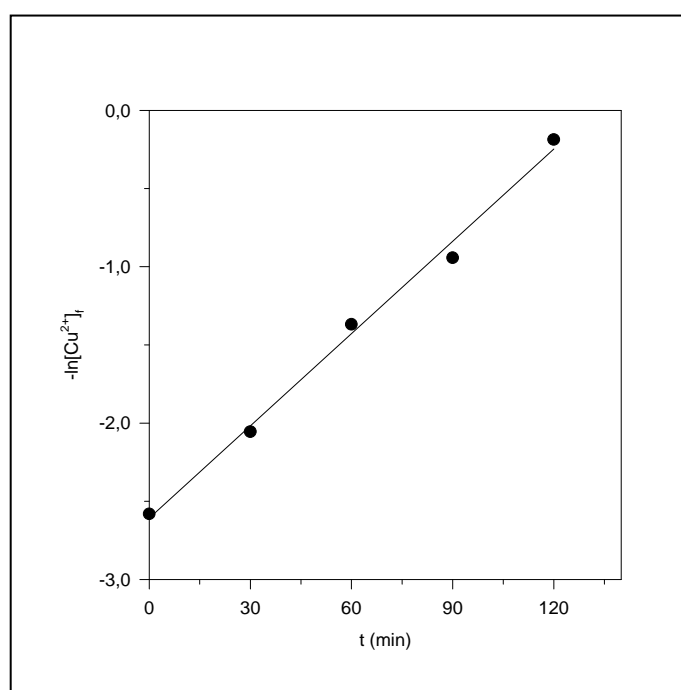


Figura 4.26. Variación de la concentración de cobre con el tiempo en la disolución cargada.

CAPÍTULO 4

A continuación, se utilizaron muestras salinas de diferente composición para comprobar cuándo se alcanzaba la máxima eficacia del sistema. En éstas, se medía espectrofotométricamente a 370 nm la absorbancia que presentaba la disolución receptora, tras formarse previamente el complejo dPKBH-Cu(II), a intervalos de tiempo de 30 minutos durante cuatro horas. De los resultados que se obtuvieron, mostrados en la figura 4.27, se comprobó que el sistema alcanzaba su máxima eficacia transcurridos 150 minutos desde el comienzo de la agitación, indicando las barras verticales la precisión de éstos.

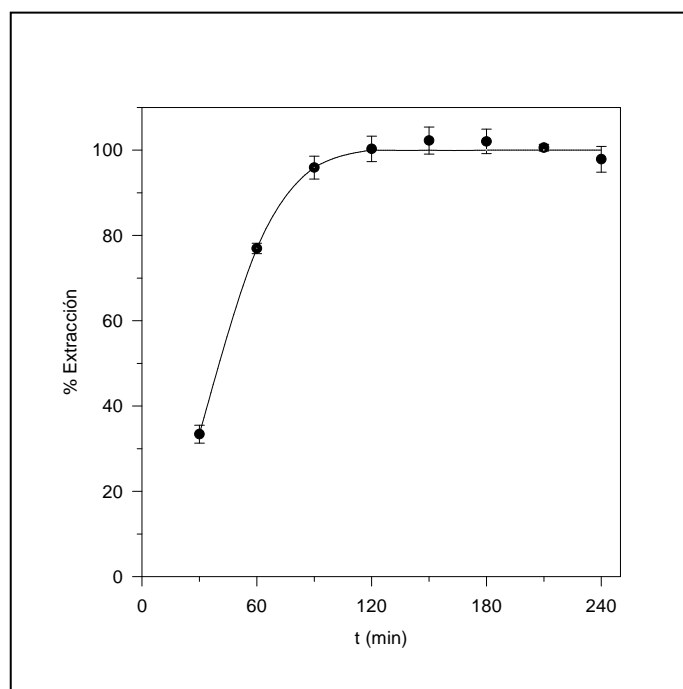


Figura 4.27. Extracción de Cu(II) con el tiempo en el sistema de membrana líquida de volumen. Condiciones como en la tabla 4.21.

Una vez que se comprobó que el transporte de cobre a través del reactivo era completo a partir de los 150 minutos, y dadas las características del vaso de membrana utilizado, el factor de preconcentración encontrado en estas condiciones resultó ser 5,65 (obtenido como el cociente entre el volumen de muestra ó disolución cargada, 48 mL, y el volumen de HClO_4 2 mol·L⁻¹ ó disolución receptora, 8,5 mL).

Análisis de cobre en muestras acuosas

Para concluir, se analizaron las mismas muestras que en el apartado anterior para cuantificar su concentración en cobre. Para ello, se tomaron alícuotas de 100 mL de cada una de ellas y se les adicionó fluoruro amónico y citrato sódico dihidratado como agentes enmascarantes. Seguidamente se ajustó su pH a 5 mediante la adición de acetato amónico y, por último, se tomaron 48 mL de cada una de ellas que se sometieron al proceso de membrana. Transcurridos 150 minutos desde el comienzo de la agitación, se medía espectrofotométricamente a 370 nm la absorbancia de la disolución receptora, después de formarse el complejo entre el analito y dPKBH.

Para cuantificar la concentración de cobre en cada una de las muestras analizadas se obtuvieron previamente las correspondientes rectas de calibrado. Para ello, se emplearon disoluciones preparadas en las mismas condiciones que la disolución receptora, esto es, en una disolución de HClO_4 $2 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$. En la tabla 4.22 se muestran los resultados que se obtuvieron para las distintas muestras analizadas junto con los valores del estadístico t de la distribución de Student y el error relativo. El valor para el parámetro t es 2,78 para cuatro grados de libertad y un nivel de probabilidad $\alpha = 0,05$. En todos los casos el valor de este estadístico es inferior al tabulado, indicando la inexistencia de errores sistemáticos en el sistema de medida. Además, los errores relativos cometidos también fueron bajos.

Tabla 4.22. Resultados obtenidos para la concentración de cobre en las muestras reales.

Muestra	$[\text{Cu(II)}]_{\text{ref}} / \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$	$[\text{Cu(II)}]_{\text{ana}} / \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$	ϵ_r (%)	t
B. Cádiz	5,02 ($\pm 0,23$)	4,99 ($\pm 0,78$)	-0,60	0,06
B. Huelva	9,56 ($\pm 0,38$)	9,52 ($\pm 1,28$)	-0,42	0,06
Agua potable	13,21 ($\pm 0,44$)	13,25 ($\pm 1,57$)	0,30	0,04

CAPÍTULO 4

CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

De los trabajos efectuados para la realización de la presente Tesis, se pueden extraer las siguientes conclusiones:

1ª. Se han desarrollado nuevos métodos espectrofotométricos para la determinación de cobre, cinc y vanadio en muestras acuosas naturales mediante su reacción con di-2-piridilcetonabenzoihidrazona (dPKBH).

★ En este sentido, se ha optimizado y validado un método espectrofotométrico para el análisis de cobre en muestras acuosas naturales que resulta sencillo, rápido y fiable. Además, presenta un límite de detección ($2,5 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) del mismo orden de magnitud que muchas técnicas atómicas y mejor que la mayoría de los métodos espectrofotométricos propuestos hasta el momento.

★ Para el análisis de cinc en muestras con matrices diferentes, se ha optimizado y validado un método espectrofotométrico que permite su determinación de manera sencilla y eficaz tras su reacción con dPKBH. El límite de detección que se ha obtenido, ($1,9 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$), lo convierte en uno de los mejores métodos espectrofotométricos para la determinación directa de cinc.

★ En el caso de vanadio, se ha optimizado y validado un método espectrofotométrico que permite la determinación individual de cada una de las dos formas químicas predominantes en sistemas acuáticos naturales (V(IV) y V(V)). Los límites de detección alcanzados ($2,0 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ y $3,2 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, para V(IV) y V(V), respectivamente), hacen que se encuentren entre los mejores métodos para la determinación directa de las diferentes especies de vanadio presentes en aguas.

2ª. Se ha demostrado cómo seleccionando cuidadosamente las condiciones de reacción entre dPKBH y las muestras, es posible desarrollar métodos que permiten la determinación individual de diferentes elementos metálicos sin las interferencias

provocadas por otros elementos presentes en éstas o por su propia matriz, en el caso de muestras salinas.

3ª. Si se dispone de instrumentación adecuada (basta un espectrofotómetro visible portátil), es posible realizar la determinación *in situ* de cobre, cinc y vanadio (IV y V) en muestras acuosas naturales empleando los métodos espectrofotométricos desarrollados.

4ª. Se ha conseguido realizar la especiación de vanadio de un modo sencillo, rápido y eficaz, obteniéndose excelentes resultados no sólo para mezclas sintéticas de ambas especies sino también en muestras reales.

5ª. Se ha optimizado y validado un método de Análisis por Inyección en Flujo (FIA) para la determinación de vanadio en muestras acuosas naturales. Para ello, se han utilizado tanto el método univariante como multivariante, mediante el método simplex modificado. En las condiciones optimizadas por el método simplex se obtenía mayor sensibilidad, aunque esta mejora repercutía negativamente en aspectos tales como:

- a) el volumen de muestra necesario, prácticamente el doble.
- b) el caudal del transportador, también superior.

No obstante, se ha conseguido reducir notablemente tanto la manipulación de muestras como de reactivos, minimizando, de este modo, los posibles errores de contaminación.

6ª. Se ha verificado la aplicabilidad de Aliquat 336 como agente extractante para vanadio en muestras salinas previo a su utilización en un sistema de preconcentración basado en membranas líquidas de volumen (MLV).

7ª. Mediante ensayos muy sencillos se ha demostrado la oxidación de las especies de vanadio(IV) a vanadio(V) en presencia de oxígeno atmosférico y condiciones ligeramente ácidas. Esto permite cuantificar la concentración total de vanadio en

CONCLUSIONES

muestras salinas, tanto procedente de especies en las que éste se encuentra con valencia (IV) como (V) utilizando el método desarrollado.

8ª. Se han optimizado las condiciones de un nuevo sistema acoplado FIA-MLV que permite la preconcentración y posterior determinación de vanadio en muestras salinas mediante el método símplex. En este sentido, las variables optimizadas fueron aquellas que tenían influencia directa sobre el sistema de membrana, esto es, el pH de las disoluciones cargada y receptora, y la concentración de Aliquat 336.

9ª. Se ha demostrado la aplicabilidad del sistema acoplado para la preconcentración y posterior determinación espectrofotométrica de vanadio en muestras salinas. Así, transcurridas 3 horas es posible alcanzar el máximo factor de preconcentración del sistema de membrana utilizado (1,625). Si se necesitan factores de preconcentración superiores, tan sólo habrá que modificar el vaso de membrana empleado de manera que la relación volumétrica entre la muestra y la disolución receptora sea mayor.

10ª. Se ha optimizado un método de Análisis por Inyección en Flujo (FIA) para la determinación de cobre en muestras acuosas naturales. Para ello, se han utilizado tanto el método univariante como el método símplex modificado. Las condiciones optimizadas por el método símplex ofrecían las siguientes ventajas frente a las obtenidas de modo univariante:

- a) el volumen de muestra necesario es bastante menor. Esto posibilita un mayor número de inyecciones para el mismo volumen de muestra.
- b) el caudal del transportador también es inferior. Esto implica un menor consumo de reactivos y, por tanto, se reduce el coste por análisis.
- c) la longitud del tubo de reacción también es menor. Por tanto, se reduce el tiempo necesario para llevar a cabo un análisis.

11ª. Se ha demostrado la aplicabilidad del nuevo sistema FIA desarrollado mediante la determinación de la concentración de cobre en muestras acuosas naturales. En este

sentido, se ha desarrollado un método automatizado sencillo, rápido y eficaz que permite la cuantificación *in situ* de cobre en muestras acuosas.

12^a. Mediante ligeras modificaciones del sistema FIA desarrollado, se han optimizado las condiciones de un nuevo FIA para acoplar a un sistema de preconcentración de cobre mediante membranas líquidas de volumen. Con el sistema FIA-MLV se consigue un factor de preconcentración de cobre de 5,43 después de 330 minutos.

13^a. Se ha desarrollado un nuevo método de extracción-reextracción por disolvente para el análisis de cobre en muestras acuosas naturales mediante el uso de 1,2-CHBBH. La optimización de las variables que afectan al sistema de extracción se ha realizado mediante el método univariante y el diseño central compuesto de segundo orden. Con este último se ha puesto de manifiesto la importancia del pH de la disolución acuosa en el sistema de extracción. Por otra parte, se ha demostrado la necesidad de emplear un modelo cuadrático, en el que se tienen en cuenta las interacciones entre las distintas variables, para optimizar un sistema en el que existe interdependencia entre éstas.

14^a. Se ha utilizado el reactivo 1,2-CHBBH como transportador de cobre en un sistema de membrana líquida de volumen. Los resultados obtenidos han sido tan satisfactorios como los mostrados por el sistema de extracción-reextracción optimizado. Además, el tiempo necesario para llevar a cabo el análisis se ha reducido. Por otra parte, también disminuye la manipulación de las muestras, con el consiguiente beneficio sobre la posible contaminación de ésta.

15^a. Si se compara con uno de los agentes transportadores para cobre en sistemas de membranas líquidas más empleados, DEHPA, se ha reducido notablemente el tiempo necesario para el análisis.

ANEXOS

ANEXO I. EL MÉTODO SÍMPLEX

- 1. SÍMPLEX DE PASO FIJO**
- 2. MÉTODO SÍMPLEX MODIFICADO**

ANEXO II. DISEÑO DE EXPERIMENTOS

ANEXO III. REACTIVOS, DISOLUCIONES Y APARATOS

- 1. REACTIVOS**
- 2. DISOLUCIONES**
- 3. APARATOS**

ANEXO I. EL MÉTODO SÍMPLEX

EL MÉTODO SÍMPLEX

Este método fue descrito por primera vez por Spendley y col.²³⁶. Está basado en la figura geométrica de un símplex, el cual es un triángulo en dos dimensiones, un tetraedro en tres dimensiones y una figura con $k+1$ vértices en k dimensiones. Por tanto, el símplex se visualiza como una figura geométrica que viene definida por un número de vértices igual a uno más que el de parámetros a optimizar²³⁷.

Para maximizar la respuesta de un sistema que depende de k factores, el proceso de optimización símplex comienza por la definición de las condiciones iniciales para cada uno de ellos. De este modo, para cada factor ha de definirse un valor inicial, nivel base, y la cantidad en la que éste puede cambiar, tamaño de paso. Con estos valores se obtienen las condiciones para los $k + 1$ vértices que componen el símplex inicial. Una vez realizados los experimentos correspondientes, se forma un nuevo símplex eliminando el vértice con la peor respuesta y sustituyéndolo por uno nuevo en la dirección opuesta. El proceso continúa hacia el óptimo realizando nuevas experiencias en las que los nuevos vértices se calculan mediante la aplicación de una serie de reglas que se describirán más adelante.

El método símplex se puede aplicar de varias formas, aunque las más habituales suelen ser la optimización símplex de paso fijo y el método simplex modificado. A continuación se describirán brevemente cada una de ellas.

1. SÍMPLEX DE PASO FIJO

Una vez que se han realizado los experimentos correspondientes al símplex inicial, para conseguir alcanzar el óptimo del modo más rápido y eficaz se aplican una serie de reglas que se relacionan a continuación:

²³⁶ Spendley, W.; Hext, G.R.; Himsworth, F.R. Sequential application of Simplex Design in Optimization and Evolutionary Operation. *Technometrics*, 4, 441, 1962.

²³⁷ Blanco, M.; Cerdá, V. *Quimiometría. Cuaderno de Ciencias y Técnicas Ambientales, Vol. 1*. Ed. AEST, Barcelona, 1988.

EL MÉTODO SÍMPLEX

1. Para formar un nuevo símplex se rechaza el vértice de peor respuesta del símplex anterior y se sustituye por otro simétrico al rechazado respecto del centro de gravedad del símplex. En la figura 1 se muestra gráficamente.

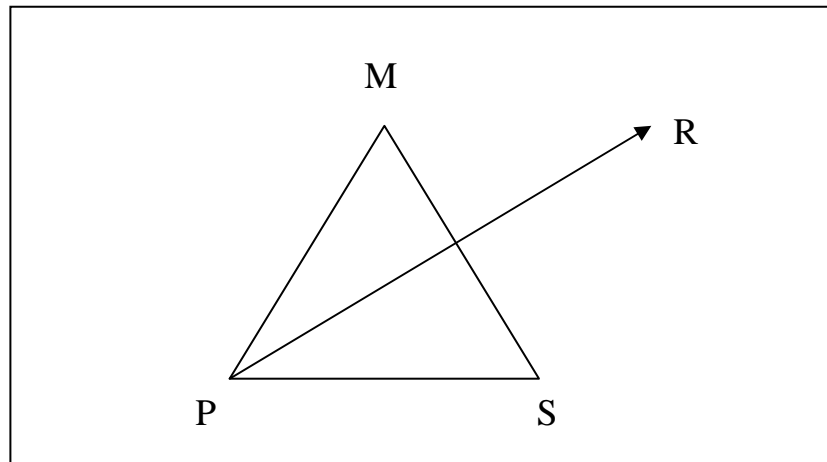


Figura 1. Reflexión del símplex en dirección opuesta al peor valor. P: peor respuesta; M: mejor respuesta; S: segunda peor respuesta.

Si la respuesta del nuevo vértice es la peor del nuevo símplex, es imposible aplicar la regla 1, ya que la nueva reflexión volvería a dar el punto eliminado anteriormente. Por tanto, se aplica la regla 2.

2. Si el nuevo punto (R) es el de peor respuesta, entonces debe eliminarse el siguiente punto con peor respuesta (S) para obtener el nuevo símplex a través de la imagen especular. El resultado es un cambio de dirección en el progreso hacia el óptimo, lo que suele ocurrir en la zona próxima al mismo. La figura 2 muestra gráficamente esta regla.

Si el punto obtenido se encuentra próximo al óptimo, los sucesivos símplex comenzarán a girar alrededor del mismo.

ANEXO I

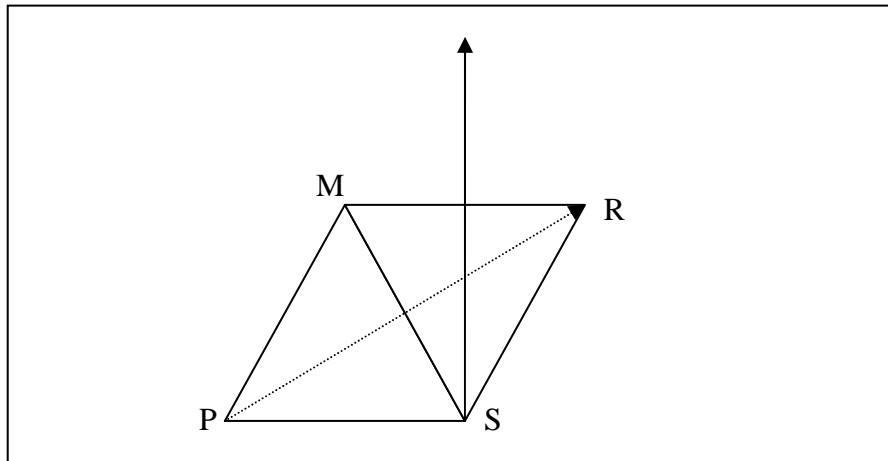


Figura 2. Cambio de dirección del simplex tras el rechazo del segundo peor punto. P: peor respuesta; M: mejor respuesta; S: segunda peor respuesta.

3. Si un vértice se mantiene en $k + 1$ simplexes sucesivos sin haberse eliminado, habrá que repetirlo antes de continuar para confirmar que el resultado obtenido es correcto y evitar que el sistema se ancle en algún resultado que sea falsamente alto. Si el resultado original era erróneo, entonces el simplex continuará en una dirección diferente, pero si era correcto, ese vértice puede considerarse el óptimo y el simplex continuará moviéndose alrededor del mismo hasta que se alcancen las condiciones iniciales.

2. MÉTODO SÍMPLEX MODIFICADO

El método simplex posee diversas variantes, todas encaminadas a acelerar la aproximación hacia el óptimo. Una de las más empleadas es el Método Simplex Modificado (MSM) propuesto por Nelder y Mead, el cual utiliza además de las reflexiones mencionadas anteriormente, expansiones, contracciones y traslaciones del simplex²³⁸. El movimiento del simplex sigue las mismas reglas mencionadas anteriormente pero aquí aparecen una serie de reglas adicionales para decidir la operación que se va a utilizar.

²³⁸ Nelder, J.A.; Mead, R. Computer Journal, 7, 308, 1965.

EL MÉTODO SÍMPLEX

Los valores del vértice reflejado se obtienen sumando al centroide (D) la distancia desde el peor valor (P) hasta D, como se muestra en la figura 3. De este modo, las coordenadas del nuevo vértice vendrán dadas por:

$$R = D + (D - P)$$

Como se puede observar, esta forma de obtener el vértice de reflexión es equivalente a la aplicación de la regla 1 en el símplex de paso fijo.

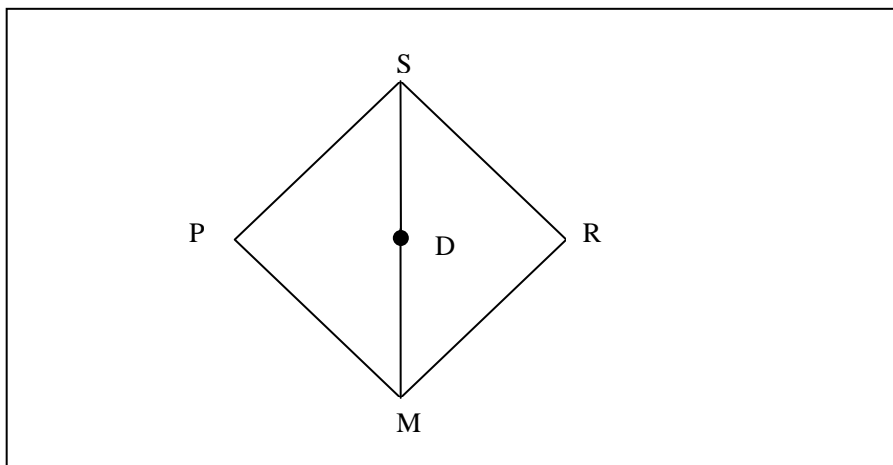


Figura 3. Reflexión (R) en el símplex modificado. P: peor respuesta; M: mejor respuesta; S: segunda peor respuesta; D: centroide.

Los nuevos movimientos del símplex modificado tendrán lugar en función de las respuestas del nuevo valor R respecto a la del punto de mejor respuesta (M). Así,

- Si la nueva respuesta es la mejor de todas, es decir, si $R > M$, entonces el nuevo símplex sufrirá una expansión (E), como se muestra en la figura 4. Para calcular las coordenadas del nuevo vértice se emplea la ecuación:

$$E = D + a(D - P) \text{ con } a > 1.$$

Generalmente $a = 2$ aunque este valor puede cambiar según la situación. El nuevo símplex estará formado por los vértices M-S-E.

- Si la nueva respuesta está comprendida entre las dos mejores respuestas del símplex anterior, es decir, $S < R < M$, entonces el nuevo símplex estará formado por los vértices M-S-R de la figura 3.

ANEXO I

c) Si la nueva respuesta es peor que la segunda mejor del símplex anterior, esto es, $R < S$, el nuevo símplex sufre una contracción (C), positiva o negativa, como se muestra en la figura 5. Para ello, se suma o resta una fracción de la distancia entre el centroide y el vértice con la peor respuesta al centroide:

1. Si la nueva respuesta es mejor que la peor del símplex anterior, $R > P$, se producirá una contracción positiva. Las coordenadas del nuevo vértice serán:

$$C^+ = D + b(D - P) \text{ con } 0 < b < 1, \text{ habitualmente } b = 0,5.$$

El nuevo símplex estará formado por los vértices M-S- C^+ .

2. Si la nueva respuesta es la peor de todas, $R < P$, tendrá lugar una contracción negativa, y las coordenadas del nuevo vértice serán ahora:

$$C^- = D - b(D - P) \text{ con } 0 < b < 1, \text{ habitualmente } b = 0,5.$$

El nuevo símplex estará formado por los vértices M-S- C^- .

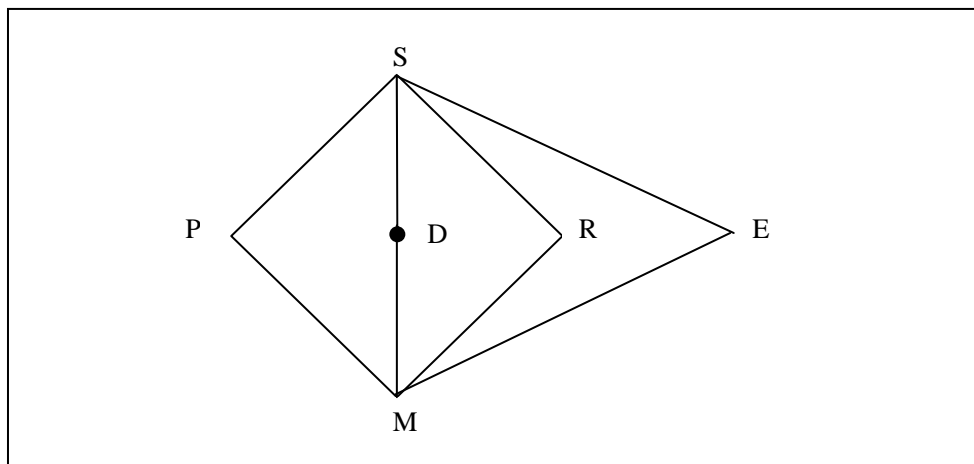


Figura 4. Expansión (E) en el método símplex modificado. P: peor respuesta; M: mejor respuesta; S: segunda peor respuesta; D: centroide.

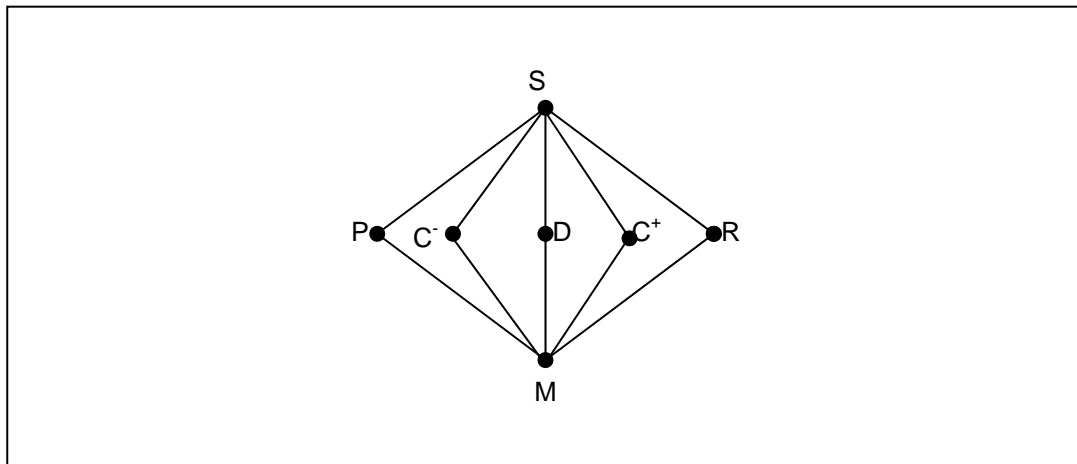


Figura 5. Contracción positiva (C^+) o negativa (C^-) en el método simplex modificado. P: peor respuesta; M: mejor respuesta; S: segunda peor respuesta; D: centroide.

Una vez que se han definido todas las variables a optimizar en el sistema, y antes de comenzar a realizar los distintos experimentos, se deben establecer las condiciones que permitan detener el simplex. En el método simplex modificado se suelen utilizar habitualmente alguna de las siguientes:

1. Establecer un número máximo de vértices, es decir, en función de las características del sistema establecer un número máximo de experimentos a realizar y no sobrepasarlo para encontrar las condiciones óptimas.
2. Establecer una distancia mínima entre vértices. A medida que el sistema se vaya acercando a las condiciones óptimas, las coordenadas de los distintos vértices estarán cada vez más próximas, por lo que previamente se puede decidir un límite inferior para el cambio de éstas. Habitualmente esto suele realizarse tomando una fracción del tamaño de paso original.
3. La variación en la respuesta es demasiado pequeña. Cuando la búsqueda se acerca al óptimo las respuestas no suelen aumentar de forma apreciable y por tanto debería terminarse la evaluación. Para encontrar las condiciones óptimas se calcula la varianza de las $k + 1$ respuestas del simplex (S_s^2 , con $V_1 = k$ grados de libertad) y se compara con una estimación previa de la varianza de la respuesta para distintas réplicas del sistema (s^2 , con V_2 grados

ANEXO I

de libertad). Cuando la variación de la respuesta se debe únicamente al error aleatorio, la relación entre ambas debe aproximarse a uno. La comparación de varianzas viene establecida por el parámetro F de la distribución de Fischer y, de acuerdo con éste, la búsqueda finalizará para un determinado valor de probabilidad, p, si $S_s^2 < F s^2$ para k y V_2 grados de libertad, respectivamente. En la tabla 1 se muestran los valores de F para distintos valores de probabilidad en función de los grados de libertad para ambas estimaciones.

Tabla 1. Valores de F para la relación de la varianza estimada del símplex (G.L. = V_1) con una varianza estimada independiente (G.L. = V_2).

$\Pr (S_s^2 / s^2) < F = p$						
Denominador G.L. (V_2)	p	Numerador G.L. (V_1)				
		2	3	4	5	6
2	0,50	1,00	1,14	1,21	1,25	1,28
	0,67	2,00	2,15	2,22	2,27	2,30
	0,75	3,00	3,15	3,23	3,28	3,31
3	0,50	0,88	1,00	1,06	1,10	1,13
	0,67	1,62	1,72	1,77	1,79	1,82
	0,75	2,28	2,36	2,39	2,41	2,42
4	0,50	0,83	0,94	1,00	1,04	1,06
	0,67	1,46	1,55	1,59	1,61	1,62
	0,75	2,00	2,05	2,06	2,07	2,08
5	0,50	0,80	0,91	0,96	1,00	1,02
	0,67	1,38	1,45	1,48	1,50	1,51
	0,75	1,85	1,88	1,89	1,89	1,89
6	0,50	0,78	0,89	0,94	0,98	1,00
	0,67	1,33	1,39	1,42	1,43	1,44
	0,75	1,76	1,78	1,79	1,79	1,78

ANEXO II. DISEÑO DE EXPERIMENTOS

ANEXO II

Todo método de análisis requiere de una optimización, la cual puede definirse como un proceso de búsqueda y localización del conjunto de valores de las variables independientes que producen el mejor resultado en el proceso de determinación analítica. Para alcanzar este objetivo se pueden utilizar técnicas de optimización *Univariantes* y *Multivariantes*. Las primeras se basan en la optimización de una variable mientras se mantienen constantes las demás, por lo que presentan el inconveniente de no tener en cuenta las relaciones o dependencias que puedan existir entre variables. Las técnicas Multivariantes pueden dividirse a su vez en diseños de optimización Secuencial (un ejemplo es el método simplex) y Simultáneos (como el diseño factorial). El método simplex ya se ha explicado en el Anexo I por lo que, a continuación, se describirán brevemente las características más importantes del diseño factorial.

DISEÑO FACTORIAL

Este tipo de optimización se utiliza cuando se tiene conocimientos previos sobre las regiones óptimas del sistema. Está basado en el estudio de todas las combinaciones de las variables que controlan la respuesta analítica en un sistema, permitiendo de este modo el estudio simultáneo de la influencia de cada factor y sus interacciones²³⁹. En este sentido, si para un determinado tratamiento existen dos variables o factores que pueden influir sobre la respuesta (designados como A y B) y cada uno de ellos pueden existir en distintos niveles “a” y “b”, respectivamente, entonces cada réplica del experimento contendrá todas las “ab” combinaciones posibles. Habitualmente el diseño factorial más empleado está basado en el estudio de k factores (o variables a optimizar), cada uno con dos posibles niveles (superior e inferior). De este modo, una réplica completa de tal diseño estará formada por 2^k observaciones, denominándose éste como un diseño factorial 2^K . Este tipo de diseños resulta adecuado cuando se consideran estimaciones de primer orden y los efectos de interacción, pero no lo es cuando los efectos de segundo orden son significativos. En tales casos, se debe recurrir a diseños

²³⁹ Montgomery, D.C. *Design and analysis of experiments*, 4th Edition, Ed. John Wiley & Sons, New York, 1997.

más complejos que contemplen relaciones cuadráticas, como el central compuesto o el 3^K . A continuación se describirán las características del diseño central compuesto.

DISEÑO CENTRAL COMPUESTO

Como ya se ha mencionado, este tipo de diseños resultan adecuados cuando se desean estudiar posibles relaciones cuadráticas e interacciones entre las variables. Consisten en un diseño factorial o factorial fraccionado 2^K al que se han añadido $2K$ puntos axiales así como n puntos centrales. En la figura 1 se muestra gráficamente un diseño central compuesto para $k = 3$.

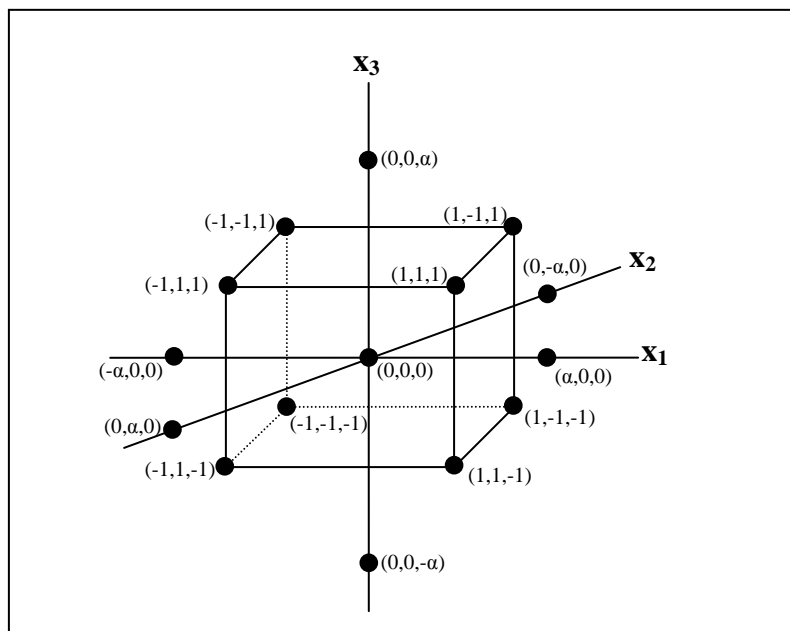


Figura 1. Diseño central compuesto para $k = 3$

Como se puede observar, para analizar este diseño será necesario realizar los quince experimentos representados por los círculos en la figura. Un experimento en el que las tres variables toman su valor intermedio (en la notación habitualmente utilizada se le asigna el valor 0, el punto central), los ocho experimentos que forman los vértices del cubo (correspondientes al diseño factorial 2^K) y los seis adicionales (correspondientes a los puntos axiales, $2k$). Para estos últimos, el valor de α debe seleccionarse de modo que el diseño sea rotatable, lo que dependerá del número de puntos

ANEXO II

de la parte factorial del diseño. De manera general, su valor se calcula como $\alpha = (n_f)^{1/4}$, siendo n_f el número de puntos de la porción factorial del diseño.

Una vez efectuados los distintos experimentos se analizan los resultados obtenidos mediante la metodología de superficies de respuesta, la cual consiste en un conjunto de técnicas matemáticas y estadísticas que permite obtener las condiciones de cada una de las variables que optimizan la respuesta del sistema. El resultado final es una ecuación de ajuste en la que se relaciona la respuesta del sistema con el conjunto de variables que tienen influencia sobre el mismo. En ésta, quedarán representadas todas las variaciones de cada una de las variables así como sus posibles interacciones.

En un modelo cuadrático en el que además se consideren las posibles interacciones entre las variables, la respuesta podrá representarse mediante la siguiente expresión:

$$\hat{y} = \hat{\beta}_0 + \sum_{i=1}^k \hat{\beta}_i x_i + \sum_{i=1}^k \hat{\beta}_{ii} x_i^2 + \sum_i \sum_j \hat{\beta}_{ij} x_i x_j$$

en la que los diferentes β_i son los parámetros de ajuste de la ecuación y las x_i indican las variables o factores estudiados.

Habitualmente, cuando se realiza un proceso de optimización, suelen buscarse las condiciones más adecuadas de cada una de las variables que hacen que la respuesta sea máxima. En otras palabras, se desea determinar los niveles de cada una de las variables que maximizan la respuesta. En tal caso, el máximo de esta función, si existe, será el conjunto de variables (x_1, x_2, \dots, x_k) que hace que las derivadas parciales de cada una de ellas sea cero. Al punto así obtenido se le denomina *Punto Estacionario*, el cual puede representar:

1. Un punto de respuesta máxima.
2. Un punto de respuesta mínima.
3. Un punto silla.

Tras obtener las coordenadas del punto estacionario, se representa la superficie de respuesta obtenida, la cual proporciona la información adicional necesaria para

DISEÑO DE EXPERIMENTOS

determinar el tipo de respuesta que representa dicho punto. Así, si la superficie de respuesta presenta forma parabólica abierta hacia abajo, el punto estacionario se corresponderá con el máximo de la figura e indicará las condiciones que maximizan la respuesta. Si, por el contrario, la parábola está abierta hacia arriba, entonces el punto estacionario representará un mínimo. Por último, si la superficie de respuesta no presenta forma parabólica, el punto estacionario se corresponderá con un punto silla. Esta misma información puede obtenerse analizando los distintos coeficientes (β_i) de la ecuación de ajuste. Así, el punto estacionario se corresponderá con un máximo cuando los valores de los coeficientes de los términos cuadráticos sean de igual magnitud y de signo negativo. Si éstos son positivos, estaremos ante el caso de que el punto estacionario representa un mínimo y, por último, si tienen signos diferentes el punto estacionario es un punto silla.

ANEXO III. REACTIVOS, DISOLUCIONES Y APARATOS

ANEXO III

1. REACTIVOS

Los reactivos utilizados en el presente trabajo se indican a continuación ordenados alfabéticamente:

- Acetato de amonio ($\text{NH}_4\text{CH}_3\text{COO}$) P.A. Merck, Alemania.
- Acetato de sodio (NaCH_3COO) P.A. Merck, Alemania.
- Ácido acético glacial (CH_3COOH , 100%) P.A. Merck, Alemania.
- Ácido bórico (H_3BO_3) P.A. Merck, Alemania.
- Ácido clorhídrico (HCl , 37% fumante) P.A. Merck, Alemania.
- Ácido nítrico (HNO_3 , 65%) P.A. Merck, Alemania.
- Ácido perclórico (HClO_4 , 60%) P.A. Merck, Alemania.
- Ácido sulfúrico (H_2SO_4 , 98%) P.A. Merck, Alemania.
- Agua desionizada.
- Aliquat 336 (Cloruro de metiltrioctilamonio). Fluka, Suiza.
- Benzoilhidracida ($\text{C}_6\text{H}_5\text{CONHNH}_2$, 98%) Ega-Chemie, Alemania.
- Bicarbonato de sodio (NaHCO_3) P.A. Merck, Alemania.
- Bis-2-etilhexilhidrógeno fosfato ($\text{C}_{16}\text{H}_{35}\text{O}_4\text{P}$, 97%) Sigma-Aldrich, Alemania.
- Bromuro de potasio (KBr) P.A. Merck, Alemania.
- 1,2-Ciclohexanodiona ($\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_2$) P. Síntesis Merck, Alemania.
- Citrato de sodio dihidratado ($\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$) P.A. Merck, Alemania.
- Cloruro de amonio (NH_4Cl) P.A. Merck, Alemania.
- Cloruro de calcio dihidratado ($\text{CaCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$) P.A. Merck, Alemania.
- Cloruro de estroncio hexahidratado ($\text{SrCl}_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$) P.A. Merck, Alemania.
- Cloruro de magnesio hexahidratado ($\text{MgCl}_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$) P.A. Merck, Alemania.
- Cloruro de potasio (KCl) P.A. Merck, Alemania.
- Cloruro de sodio (NaCl) P.A. Merck, Alemania.
- Di-2-piridil cetona ($\text{C}_{11}\text{H}_8\text{O}$) Ega Chemie, Alemania.
- Dodecano ($\text{C}_{12}\text{H}_{26}$, 95%). Fluka, Suiza.
- Dodecanol ($\text{C}_{12}\text{H}_{26}\text{O}$, 97%). Fluka, Suiza.
- Etanol absoluto ($\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$, 96%) P.A. Merck, Alemania.
- Fluoruro de amonio (NH_4F) P.A. Merck, Alemania.

Reactivos, disoluciones y aparatos

- Fluoruro de sodio (NaF) P.A. Merck, Alemania.
- Fosfato ácido de potasio (KH_2PO_4) P.A. Merck, Alemania.
- Fosfato ácido de sodio (Na_2HPO_4) P.A. Merck, Alemania.
- Heptamolibdato de amonio tetrahidratado ($(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$) P.A. Merck, Alemania.
- Hidróxido amónico (NH_4OH , 25%) P.A. Merck, Alemania.
- Keroseno Purum Fluka, Suiza.
- Nitrato de amonio (NH_4NO_3) P.A. Merck, Alemania.
- Nitrato de potasio (KNO_3) P.A. Merck, Alemania.
- Nitrato de sodio (NaNO_3) P.A. Merck, Alemania.
- Nitrito de sodio (NaNO_2) P.A. Merck, Alemania.
- Oxalato de amonio hidratado ($(\text{NH}_4)_2\text{C}_2\text{O}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$) P.A. Merck, Alemania.
- Perclorato de sodio (NaClO_4) P.A. Merck, Alemania.
- Sulfato de amonio ($(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$) P.A. Merck, Alemania.
- Sulfato de potasio (K_2SO_4) P.A. Merck, Alemania.
- Sulfato de sodio (Na_2SO_4) P.A. Merck, Alemania.
- Tartrato de antimonio y potasio hemihidratado ($\text{C}_4\text{H}_4\text{O}_7\text{KSb} \cdot \frac{1}{2} \text{H}_2\text{O}$) P.A. Merck, Alemania.
- Tolueno ($\text{C}_6\text{H}_5\text{CH}_3$) P.A. Merck, Alemania.
- Yoduro de potasio (KI) P.A. Merck, Alemania.
- Patrón de $1\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ Merck Titrisol, Alemania de:
 - Aluminio (III) (AlCl_3 en H_2O).
 - Antimonio (III) (SbCl_3 en HCl del 24%).
 - Arsénico (V) (As_2O_5 en H_2O).
 - Bario (II) (BaCl_2 en HNO_3 0,5 M).
 - Berilio (II) (BeCl_2 en HCl 1M).
 - Bismuto (III) ($\text{Bi}(\text{NO}_3)_3$ en HNO_3 0,5 M).
 - Cadmio (II) ($\text{Cd}(\text{NO}_3)_2$ en HNO_3 0,5 M).
 - Calcio (II) (CaCl_2 en HCl del 6,5%).
 - Cinc (II) (ZnCl_2 en HCl del 0,06%).
 - Cobalto (II) (CoCl_2 en H_2O).

ANEXO III

- Cobre (II) ($\text{Cu}(\text{NO}_3)_2$ en HNO_3 0,5 M).
- Cromo (III) (CrCl_3 en HCl del 4,2%).
- Estaño (II) (SnCl_2 en HCl 5 M).
- Estroncio (II) (SrCl_2 en HCl del 7%).
- Hierro (III) ($\text{Fe}(\text{NO}_3)_3$ en HNO_3 0,5 M).
- Magnesio (II) (MgCl_2 en HCl del 6%).
- Manganeso (II) ($\text{Mn}(\text{NO}_3)_2$ en HNO_3 0,5 M).
- Mercurio (II) ($\text{Hg}(\text{NO}_3)_2$ en HNO_3 0,5 M).
- Molibdeno (VI) ($(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$ en NH_4OH del 0,7%).
- Níquel (II) ($\text{Ni}(\text{NO}_3)_2$ en HNO_3 0,5 M).
- Plata (I) (AgNO_3 en HNO_3 del 5%).
- Plomo (II) ($\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ en HNO_3 0,5 M).
- Selenio (IV) (SeO_2 en HNO_3 del 6,3%).
- Silicio (IV) (SiCl_4 en NaOH 5 M).
- Titanio (IV) (TiCl_4 en HCl 5 M).
- Vanadio (IV) (VO_2 en H_2SO_4 al 8,6%).
- Vanadio (V) (NH_4VO_3 en HNO_3 0,5 $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$).

2. DISOLUCIONES

A continuación se indican las diferentes disoluciones utilizadas en el presente trabajo ordenadas en función de los diferentes capítulos en los que se ha estructurado esta memoria. Algunas de ellas se han empleado en varios por lo que tan sólo se mencionarán en el primer capítulo en el que se utilizaron.

Capítulo 2

Disolución dPKBH 0,4% (m/v). Se pesan 0,100 g del reactivo sintetizado y se disuelven en 25 mL de etanol. Por dilución de ésta se preparan las distintas disoluciones de reactivo necesarias.

Reactivos, disoluciones y aparatos

Disolución Reguladora de Fosfatos $0,333 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$. Para preparar esta disolución se pesan 4,630 g de Na_2HPO_4 y se disuelven en unos 80 mL de agua bidestilada. A continuación se pesan 0,125 g de KH_2PO_4 y se disuelven en la disolución anterior. Por último, se enrasa a 100 mL con agua bidestilada. El pH de esta disolución es 8,3.

Disolución Reguladora de Fosfatos $0,5 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$. Para preparar esta disolución se pesan 6,815 g de KH_2PO_4 y se disuelven en unos 80 mL de agua bidestilada. A continuación se añade NaOH para ajustar el pH a 6. Por último, se enrasa a 100 mL, quedando el pH final de esta disolución en 6,1.

Disolución Reguladora Hac/NaAc $0,2 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$. Para preparar esta disolución se pesa la cantidad necesaria de acetato sódico anhidro, NaCH_3COO , y se disuelve en un poco de agua desionizada. A continuación se adiciona el volumen adecuado de ácido acético glacial, CH_3COOH , y se disuelve en la disolución anterior. Por último, se enrasa con agua desionizada. El pH de esta disolución es 4,7.

Capítulo 3

Disolución Reactivo FIA. Esta disolución se utilizó para llevar a cabo la puesta a punto del método de determinación de vanadio en continuo (FIA). Para ello, se pesan 0,106 g del reactivo sintetizado (dPKBH) y se disuelven en 25 mL de etanol. A continuación se adicionan 250 mL de la disolución reguladora de acético/acetato $0,2 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ y se enrasa con agua bidestilada hasta 500 mL. La concentración final de esta disolución es $7,0\cdot 10^{-4} \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ en dPKBH con un 5% de etanol y $0,1 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ de tampón.

Disolución de Aliquat 336. Se pesa la cantidad necesaria de este reactivo y se disuelve en dodecano añadiendo dodecanol para facilitar la completa disolución. Por último se enrasa al volumen adecuado con dodecano.

Disolución de NH_4OH $0,1 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ en NaNO_3 $0,6 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$. Para preparar 100 mL de esta disolución, se pesan 5,110 g de nitrato de sodio y se disuelven en un poco de agua

ANEXO III

desionizada. A continuación se añaden 752 μL de hidróxido amónico concentrado y se enrasa hasta 100 mL. Para obtener estas disoluciones a diferentes valores de pH, antes del enrase se adicionaban los volúmenes adecuados de ácido nítrico o hidróxido sódico.

Disolución de 1 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ V(IV) en acetato sódico 0,1 $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ y 35 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ NaCl. Se pesan 0,82 g de acetato sódico y 3,5 g de cloruro sódico y se disuelven en un poco de agua desionizada. A continuación se añaden 1 mL del patrón de 100 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de V(IV) y 60 μL de ácido acético concentrado y se enrasa a 100 mL con agua desionizada. Para obtener estas disoluciones con valores diferentes de pH se adicionan alícuotas de ácido nítrico o hidróxido sódico antes del enrase.

Capítulo 4

Disolución Reactivo FIA (1). Esta disolución se utilizó para llevar a cabo la puesta a punto del método de determinación de cobre en continuo (FIA). Para ello, se pesan 0,050 g del reactivo sintetizado y se disuelven en 50 mL de etanol. A continuación se adicionan 25 mL de la disolución reguladora de fosfatos 0,333 $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ y se enrasa con agua desionizada hasta 500 mL. La concentración final de dPKBH es $3,3\cdot 10^{-4}$ $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ con un 10% de etanol y la de tampón fosfatos $1,67\cdot 10^{-2}$ $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$.

Disolución Reactivo FIA (2). Esta disolución se empleó para aplicar el método de determinación de cobre en continuo acoplado al sistema de membrana líquida de volumen. Para prepararla se pesan 0,050 g del reactivo sintetizado y se disuelven en 50 mL de etanol. A continuación se adicionan 250 mL de la disolución reguladora $\text{NH}_4\text{OH}/\text{NH}_4\text{Cl}$ 3 $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ enrasando por último a 500 mL con agua desionizada. La concentración final en el matraz es $3,3\cdot 10^{-4}$ $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ dPKBH con un 10 % de etanol y 1,5 $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ de $\text{NH}_4\text{OH}/\text{NH}_4\text{Cl}$.

Disolución 1,2-CHBBH 2,57 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$. Se pesan 0,089 g del reactivo sintetizado y se disuelven en 2 mL de dimetilformamida (DMF) enrasando a 100 mL con tolueno. Por dilución de ésta se preparan las distintas disoluciones de reactivo necesarias.

Disolución Reguladora $\text{NH}_4\text{OH}/\text{NH}_4\text{Cl}$ $3 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$. Para preparar esta disolución se pesan 22,786 g de cloruro amónico y se disuelven en unos 200 mL de agua desionizada. A continuación se adicionan 25 mL de hidróxido amónico concentrado (25%) y se enrasa a 250 mL con agua desionizada.

Disolución de ácido nítrico $2,13 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$. Esta disolución se prepara diluyendo 34,7 mL de ácido nítrico concentrado (Merck, 65%) en agua desionizada hasta enrase a 250 mL.

3. APARATOS

- Espectrofotómetro UV/Vis PU 8750, Phillips (Holanda).
- Espectrómetro de Absorción Atómica Solaar M, Thermo Elemental (Gran Bretaña).
- Espectrómetro de Plasma Acoplado Inductivamente, Iris Intrepid, Thermo (Gran Bretaña).
- Polarógrafo, Procesador para análisis de trazas 746 VA y conjunto de electrodos 747 VA, Metröhm (Suiza).
- Bomba peristáltica Minipuls 3, Gilson (Francia).
- Tubos de Tygon para bomba peristáltica de d.i. = 1,14 y 1,42 mm, Elkay (EE.UU.).
- Válvula de inyección modelo 50, Rheodyne Inc. (EE.UU.)
- Cubeta de cuarzo de 10 mm de paso de luz, Hellma, Mulheim (Alemania).
- Cubeta FIA de 10 mm de paso de luz, Hellma, Mulheim (Alemania).
- pH-metro modelo 2001 con electrodo combinado Ag/AgCl, Crison (España).
- Agitador magnético modelo Agimatic S, Selecta (España).
- Agitador magnético y calentador modelo Agimatic N, Selecta (España).
- Baño de ultrasonidos modelo Ultrasons, Selecta (España).
- Agitador de balanceo Heidolph Promax 2020.

